

Synthese von Derivaten polymerer α -Glucane und Versuche zu ihrer technischen Verwendung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Albert-Ludwigs-Universität
zu Freiburg im Breisgau

vorgelegt von
Laszlo Könczöl
aus Dingolfing

1979

1980

Synthese von Derivaten polymerer α -Glucane und Versuche zu ihrer technischen Verwendung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Albert-Ludwigs-Universität
zu Freiburg im Breisgau

vorgelegt von
Laszlo Könczöl
aus Dingolfing

1979

Dekan: Prof.Dr.G.Wegner
Leiter der Arbeit: Prof.Dr.K.Wallenfels
Referent: Prof.Dr.K.Wallenfels
Korreferent: Doz.Dr.M.Hallensleben

Tag der Bekanntgabe des Prüfungsergebnisses: 17.April 1980



Herrn Professor Dr.K.Wallenfels möchte ich für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes sowie sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit herzlich danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr.H.Bender für viele wertvolle Hinweise sowie für die Überlassung der verwendeten Polysaccharide.

Herrn Doz.Dr.M.Hallensleben bin ich Dank schuldig für seine praktische und theoretische Unterstützung bei Polymerisationsproblemen.

Meinen Kollegen und Kolleginnen am Lehrstuhl Biochemie danke ich für ihre ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Nicht zuletzt möchte ich auch meinen Eltern, die mir das Studium der Chemie ermöglichten, sowie meiner Frau, die durch ihr Verständnis die Durchführung und den Abschluß dieser Arbeit sehr erleichterte, von Herzen danken.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	1
1.1. Entwicklung der chromatographischen Methoden auf Polysaccharidbasis	1
1.2. Gelfiltration mit Dextranderivaten	2
1.3. Andere chromatographische Methoden auf Poly- saccharidbasis	3
1.4. Aufgabenstellung	5
2. Produkte aus Pullulan und ihre Anwendung	7
2.1. Das Polysaccharid Pullulan	7
2.2. Vernetztes Pullulan	11
2.2.1. Bisherige Entwicklung	11
2.2.2. Herstellung von Pullulangelen	13
2.2.3. Gelfiltration mit Pullulangelen	16
2.2.3.1. Theorie der Gelfiltration	16
2.2.3.2. Gelchromatographische Trennungen an Pullulan- gelen	19
2.2.4. Folien aus vernetztem Pullulan	26
2.2.5. Elektrophorese in Pullulangelen	27
2.3. Hochquellbares Pullulangel	29
2.4. Mercaptoäthyl- und Aminoäthylpullulan	31
3. Produkte aus verflüssigter Stärke und ihre Anwendung	33
3.1. Klebsiella-verflüssigte Stärke	33
3.2. Herstellung und Eigenschaften von Gelen aus verflüssigter Stärke	34
4. Derivate von α -Cyclodextrin (Cyclohexaamylose) und ihre Anwendung	37
4.1. α -Cyclodextrin und seine Eigenschaften	37
4.2. Carboxymethylcyclodextrin	40
4.3. Hydroxyäthylcyclodextrin	41
4.3.1. Darstellung von Hydroxyäthyl- α -cyclodextrin ...	41
4.3.2. Methyliertes Hydroxyäthyl- α -cyclodextrin	45
4.3.3. Vernetztes Hydroxyäthylcyclodextrin	46

4.3.4.	Einschlußchromatographie an vernetztem Hydroxyäthyl- α -cyclodextrin	49
4.4.	Hochquellbares α -Cyclodextringel	53
5.	Zusammenfassung	56
6.	Experimenteller Teil	60
6.1.	Pullulan	60
6.1.0.	Reinigung des Pullulan	60
6.1.1.	Mercaptoäthylisierung des Pullulan	60
6.1.2.	Aminoäthylisierung von Pullulan	61
6.1.3.	Vernetzung des Pullulan	62
6.1.3.1.	Vernetzung in Dimethylsulfoxid	62
6.1.3.2.	Vernetzung in Wasser/Toluol	62
6.1.3.3.	Vernetzung in Wasser	63
6.1.4.	Pfropfpolymerisierung mit Acrylnitril	64
6.2.	Verflüssigte Stärke	64
6.2.1.	Vernetzung mit Epichlorhydrin	64
6.2.2.	Pfropfpolymerisierung mit Acrylnitril	65
6.3.	α -Cyclodextrin (Cyclohexaamylose)	66
6.3.0.	Reinigung	66
6.3.1.	Carboxymethylierung von α -CD	66
6.3.2.	Hydroxyäthylisierung von α -CD	67
6.3.3.	Methylierung von Hydroxyäthyl- α -CD	68
6.3.4.	Vernetzung von Hydroxyäthyl- α -CD	69
6.3.5.	Vernetzung von α -CD	69
6.3.6.	Pfropfpolymerisation mit Acrylnitril	70
6.3.7.	Jodeinschlußkomplexe mit α -CD und seinen Derivaten	70
6.4.	Analytische Methoden	71
6.4.1.	Bestimmung der Carboxymethylgruppen	71
6.4.2.	Wasseraufnahmefähigkeitsmessungen	72
6.4.2.1.	Wasserrückhaltevermögen von ECH-vernetzten Gelen	72
6.4.2.2.	Wasseraufnahme von AN-Pfropfpolymeren	73
6.4.3.	Bestimmung von Kristallwasser nach Karl Fischer	73

	Seite
6.4.4. Glucose-Bestimmung mit Anthron	75
6.4.5. Methoxyl- und Hydroxyäthyl-Bestimmung	77
6.5. Flotieren von Gelen	78
6.6. Füllung und Betrieb von Säulen zur Gel- chromatographie	79
6.7. Einschlußchromatographie	82
6.8. Folienherstellung	83
6.9. Elektrophorese	84
6.10. Enzymatischer Abbau von α -Cyclodextrin und Hydroxyäthyl- α -Cyclodextrin	85
6.11. Verwendete Substanzen	87
7. Literaturverzeichnis	88
8. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	97

1. Einleitung und Problemstellung

1.1. Entwicklung der chromatographischen Methoden auf Polysaccharidbasis

Unter den Methoden zur Stofftrennung nehmen die verschiedenen Formen der Chromatographie einen immer breiteren Raum ein. Die chromatographischen Verfahren beruhen auf der Verteilung von Gemischen zwischen zwei Hilfsphasen, von denen die eine ruht und die andere sich bewegt. Die ruhende Phase kann fest oder flüssig sein, die bewegliche flüssig oder gasförmig. Da die Chromatographie mit einer gasförmigen mobilen Phase (Gaschromatographie) das Verdampfen der zu trennenden Substanzen erfordert, ist sie für viele empfindliche oder hochmolekulare Substanzen, besonders in der Biochemie, nicht anwendbar. Auf diesem weiten Gebiet werden daher vor allem chromatographische Methoden mit flüssiger mobiler Phase angewendet. Wegen der Empfindlichkeit einer großen Anzahl von Substanzen, z.B. von Enzymen, müssen auch an die stationäre Phase besondere Anforderungen gestellt werden. Hier erwiesen sich Trennmittel aus Polysacchariden als besonders geeignet. Die Erforschung von Polysacchariden als chromatographische Trennmittel ist erst vor kaum dreißig Jahren in Angriff genommen worden.

Aufgrund der Trennung von Hydrolyseprodukten der Amylose an Agar-Gel schufen Synge und Tiselius¹⁾ im Jahr 1950 den Begriff "Gelfiltration". In den folgenden Jahren wurden verschiedene Polysaccharide auf ihre Verwendbarkeit als Trenn-

mittel untersucht.

Stärke, als eines der am leichtesten zugänglichen und billigsten Polysaccharide, wurde zunächst verwendet. Die Untersuchungen von Lindquist und Horgards²⁾ mit Säulen, die mit in Wasser gequollenem Stärkekegel gefüllt waren, zeigten, daß sich Peptidmischungen in nieder- und höhermolekulare Fraktionen trennen ließen. Lathe und Ruthoen^{3,4)} gelang es, durch Verwendung verschiedener Stärkesorten Moleküle verschiedener Größenordnungen aufzutrennen und ihre R_F -Werte zu bestimmen. Ihre Arbeiten zeigten, daß die Elutionsgeschwindigkeit mit dem Molekulargewicht steigt. Auch eine Abhängigkeit der Elutionsgeschwindigkeit vom pH konnte gefunden werden. Daneben wurde von Polson^{5,6)} Agar-Gel und von Deuel und Neukom⁷⁾ vernetztes Galaktomannan als Trennmittel untersucht.

1.2. Gelfiltration mit Dextranderivaten

Erst die Einführung von vernetztem Dextran in das Gebiet der Gelfiltration durch Porath und Flodin⁸⁾ und ihre Forschungen auf diesem Gebiet führten zur allgemeinen Anerkennung und breiteren Anwendung dieser Methode. Sie zeigten, daß auf Dextrangel Oligo- von Polysacchariden getrennt und Proteine entsalzt werden können⁸⁾, daß Polypeptide und Proteine sich auf Dextrangel fraktionieren lassen⁹⁾ und eine Reihe weiterer Möglichkeiten der Trennung und Reinigung von

Naturstoffen, Proteinen und Peptiden^{10,11,12}). Als wesentliche Vorteile der Gelfiltration über Dextrangele nannte Porath¹²) den weiten Anwendungsbereich, da z.B. der gesamte Bereich von den monomeren Aminosäuren über Peptide verschiedener Größe bis zu Proteinen durch verschieden stark vernetztes Dextran erfaßt werden kann, die Variationsmöglichkeit des pH-Wertes des Laufmittels und der Substituenten am Gel, die symmetrische Verteilung jedes Produkts auf der Säule bzw. im Eluat, die hohe Kapazität der Gele, die gute Reproduzierbarkeit der erzielten Ergebnisse sowie die leichte Regenerierbarkeit und damit große Wirtschaftlichkeit der Gele. Eine erste Zusammenfassung der Arten der Darstellung und der Anwendungsbereiche und -methoden gab Flodin¹³). In der Folgezeit erschien eine Flut von Veröffentlichungen über Modifikation und Anwendung der mittlerweile unter dem Namen "Sephadex" handelsüblichen Dextrangele sowie über die als "Sepharose" bekannten, zuerst von Porath et al¹⁴) beschriebenen, aus vernetztem Agar und Agarose bestehenden Gele.

1.3. Andere chromatographische Methoden auf Polysaccharidbasis

Neben der auf der unterschiedlichen Molekülgröße der zu trennenden Substanzen basierenden Gelfiltration können die genannten Gele durch die Wahl geeigneter Substituenten auch für andere chromatographische Trennprinzipien verwendet wer-

den. So wurden durch Einführung von ionischen funktionellen Gruppen wie Diäthylaminoäthyl (DEAE), Diäthyl-(2-hydroxypropyl)-aminoäthyl (DAE), Carboxymethyl (CM) und Sulfo-
propyl (SP) in verschiedene Sephadex-Typen Ionenaustauscher für verschiedene Anwendungsbereiche hergestellt¹⁵⁾. Unter anderem konnten durch Ionenaustauschchromatographie, die auf der Wechselwirkung ionischer Gruppen und deren Dissoziation bei verschiedenem pH-Wert oder Ionenstärke basiert, zahlreiche Proteine^{16,17)}, Hormone^{18,19)}, Nucleinsäuren^{20,21)}, Nucleotide²²⁾ und Kohlehydrate²³⁾ getrennt bzw. gereinigt werden. Außer den "Sephadex"-ionenaustauschern wurden bereits früher auch Cellulose-Derivate auf ihre Verwendbarkeit als Ionenaustauscher untersucht^{24,25)} und finden heute besonders als DEAEA-Cellulose Verwendung als Trennmittel in der Biochemie^{26,27)}.

Ein weiteres, gerade in den letzten Jahren erschlossenes Anwendungsgebiet von substituierten Polysacchariden (besonders "Sepharose" und Cellulose) ist die Affinitätschromatographie²⁸⁾. Sie beruht auf der spezifischen Wechselwirkung von zwei Reaktionspartnern, dem Effektor, der hier kovalent an das Polysaccharid gebunden ist, und seinem meist makromolekularen Reaktionspartner, die miteinander stabile Komplexe bilden (z.B. Inhibitor und Enzym). Diese Methode wird vor allem für die Enzymisolierung und -reinigung^{29,30)}, aber auch zur Isolierung von Inhibitoren³¹⁾ und der Trennung von Nucleotiden³²⁾ verwendet.

Schließlich wäre noch die kovalente Chromatographie zu nen-

nen, bei der kovalente Disulfidbindungen zwischen dem Polysaccharid-Träger und thiolgruppenhaltigen Enzymen geschlossen werden^{33,34)}.

Neben diesen säulenchromatographischen Methoden bliebe die Dünnschichtchromatographie zu erwähnen, bei der auch Polysaccharide, besonders Cellulose und Cellulosederivate, als Sorptionsmittel Eingang gefunden haben³⁵⁾.

Eine weitere Methode der Stofftrennung, bei der auch Polysaccharidderivate Verwendung finden, ist die Elektrophorese³⁶⁾. Dieses Verfahren unterscheidet sich insofern von den chromatographischen Methoden, als es auf den Unterschieden in den Wanderungsgeschwindigkeiten sowie der Wanderungsrichtung verschiedener elektrisch geladener Teilchen in einem elektrischen Feld beruht. Als Trägermaterialien fanden bisher neben den meisten anderen auch für chromatographische Methoden gebräuchlichen Materialien eine Reihe von Polysacchariden, darunter auch das Dextrangel Sephadex⁸⁾, Verwendung³⁶⁾.

1.4. Aufgabenstellung

Diese Trennmittel auf Polysaccharidbasis haben große Fortschritte auf dem Gebiet der Substanztrennung, -reinigung und -charakterisierung gebracht. Sie haben aber dennoch eine Reihe von Mängeln, die durch die Struktur oder Herstellweise

ihrer Ausgangsverbindungen bedingt sind. Ein wesentlicher Nachteil ist die Abbaubarkeit durch die Enzyme vieler Mikroorganismen. Besonders Gele auf Dextran- und Agarosebasis sind sehr anfällig für Mikroorganismen. Daher sollten Trennmittel auf der Grundlage von Poly- oder Oligosacchariden hergestellt werden, die nur von wenigen spezifischen Enzymen angegriffen werden, wie Pullulan und Cyclo-dextrin. Ein weiterer Mangel bisher verwendeter Polysaccharidgele ist ihre zum Teil nicht genau definierte Struktur, sowie ihre teilweise nur auf einem schmalen Sektor liegende Verwendbarkeit. Auch hier sollte versucht werden, durch den Einsatz neuer, genau definierter Kohlenhydrate bessere Ergebnisse zu erzielen. Schließlich ist noch ein wesentlicher Aspekt zu nennen, der die Einführung neuer Ausgangssubstanzen für chromatographische Trennmittel notwendig erscheinen läßt: der wirtschaftliche. Besonders die Gele auf Dextran- und Agarosebasis, aber auch die große Anzahl synthetischer Gele, die in den letzten Jahren Verwendung gefunden haben, sind aufgrund der speziellen Ausgangsprodukte und ihrer Herstellungsweise sehr teuer. Demgegenüber wären gerade Stärke als ein billiges Massenprodukt, aber auch das heute bereits im Tonnenmaßstab hergestellte Pullulan preiswerte Ausgangsverbindungen, die zu niedrigeren Preisen für derartige Trennmittel führen sollten.

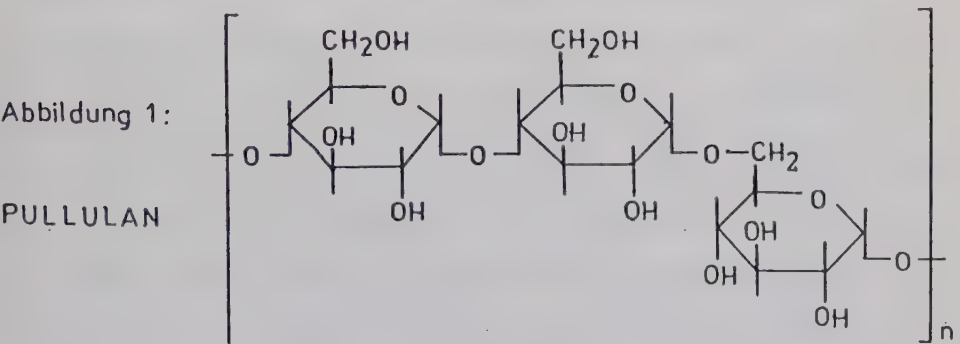
Aus den genannten Gründen sollten im Rahmen dieser Arbeit neue kohlenhydrathaltige Trennmittel auf der Grundlage von Pullulan, einer modifizierten Stärke, sowie von α -Cyclo-dextrin hergestellt werden.

Daneben sollte auch auf sonstige technische Verwertbarkeit der aus den genannten Kohlenhydraten hergestellten Produkte geachtet werden. Hierbei schienen besonders folienbildende Derivate des Pullulan wegen der Fähigkeit der Mutterverbindung, sauerstoffundurchlässige Folien zu bilden, vielversprechend zu sein.

2. Produkte aus Pullulan und ihre Anwendung

2.1. Das Polysaccharid Pullulan

Der Hefepilz *Pullularia pullulans* (syn. *Dermatium pullulans*) bildet auf bestimmten Nährböden einen extracellulären Schleimstoff; dieser besteht bei geeigneten Kulturbedingungen ausschließlich aus einem Polysaccharid, das als Pullulan bezeichnet wird³⁷⁻⁴¹⁾. Die Struktur des Pullulan



wurde von Wallenfels und Mitarbeitern aufgeklärt und als ein durch α -1,6-Bindungen verknüpft⁴²⁻⁴⁴es Polymeres der Maltotriose vom Polymerisationsgrad ca. 480 angegeben).

Es liegt also wie bei Amylose (Abb. 2) oder Dextran (Abb. 3) ein α -Glucan vor, das wie Amylopectin oder Glykogen (Abb. 4) α -1,4- und α -1,6-Bindungen aufweist. Dennoch unterscheidet sich Pullulan in seiner Struktur und seinen Eigenschaften wesentlich von den genannten Polysacchariden. Das sehr gut wasserlösliche Pullulan bildet keinen stark gefärbten Jodkomplex wie Stärke oder Glykogen³⁷). Amylose, Amylopectin und Glykogen bestehen in weiten Bereichen aus langen, nur α -1,4-verknüpften Anhydroglucoseketten, die eine helicale Struktur besitzen.

In diese Helices kann Jod eingelagert werden, was für die Farbreaktion verantwortlich ist⁴⁵). Bei Pullulan jedoch liegen keine längeren ausschließlich α -1,4-verknüpften Ketten und auch keine Helices vor.

Bei der Hydrolyse von permethyliertem Pullulan findet sich im Hydrolysat keine Dimethylglucose, was beweist, daß Pullulan rein linear aufgebaut ist und keine Verzweigungen im Molekül besitzt⁴³). Dies setzt es in Gegensatz zu den meisten anderen bisher erwähnten Polysacchariden, da sogar Amylose aus geringfügig verzweigten Molekülen besteht, wie neuere Forschungsarbeiten zeigen⁴⁶).

Aber auch gegenüber dem wichtigsten in der Natur vorkommenden linearen Polysaccharid, der Cellulose (Abb. 5), zeigt

Abb. 2:
AMYLOSE

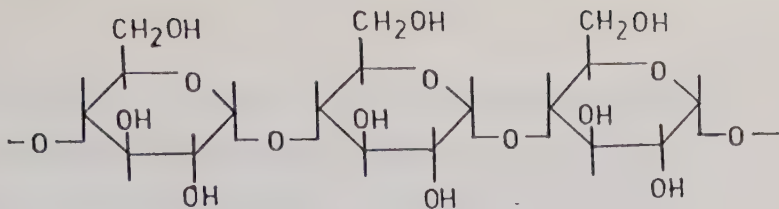


Abb. 3 :
DEXTRAN

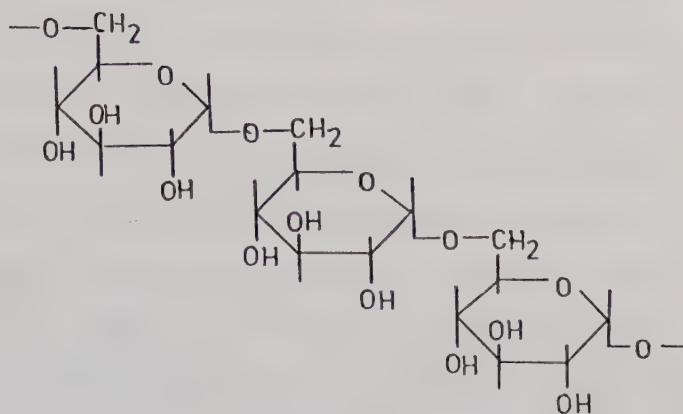


Abb. 4:
GLYKOGEN

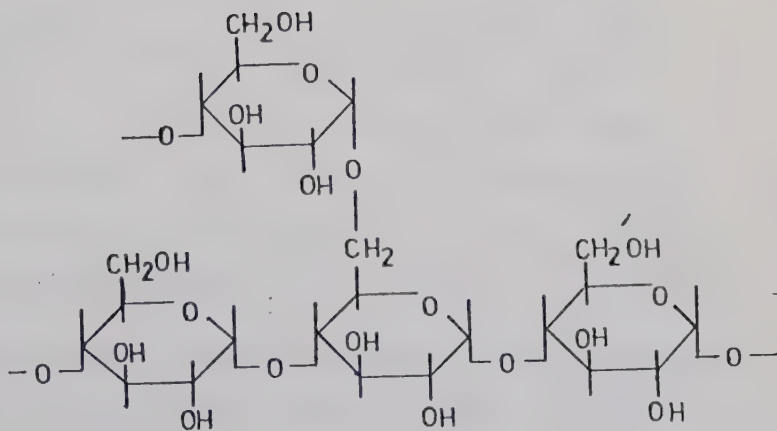
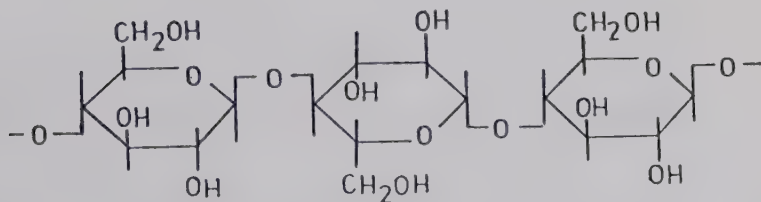


Abb. 5:
CELLULOSE



das Pullulan gravierende Unterschiede. Pullulan bildet keine Elementarfibrillen, zu welchen die Molekülketten der Cellulose, die eine β -1,4-verknüpfte Polyglucose ist, zusammengelagert sind, und ist daher wasserlöslich, im Gegensatz zur Cellulose. Auch hinsichtlich der enzymatischen Spaltbarkeit wirkt sich die Verschiedenheit der Strukturen von Pullulan und der bisher genannten Polysaccharide aus. Daß das ausschließlich durch α -Bindungen verknüpfte Pullulan für celluloseabbauende, also β -Glucosidbindungen spaltende Enzyme kein Substrat ist, ist evident. Jedoch können auch die meisten Stärke abbauenden Enzyme Pullulan nicht spalten⁴⁴⁾. α -Amylasen, die α -1,4-Bindungen im Inneren von Glucanketten spalten, haben auf Pullulan keine Wirkung, obwohl zwei Drittel seiner glykosidischen Bindungen α -1,4-Bindungen sind. Dies liegt daran, daß beim Pullulan nur jeweils zwei 1,4-Bindungen aufeinander folgen, während α -Amylasen nur bei längeren α -1,4-Bindungsfolgen wirken. Die β -Amylase spaltet bei der Stärke die α -1,4-Bindungen in der Weise, daß vom nicht reduzierenden Ende Maltosegruppen abgespalten werden. Dies wäre bei der Pullulankette maximal einmal möglich; es ist daher verständlich, daß Pullulan von β -Amylase nicht abgebaut wird. Dagegen wird Pullulan von Glucamylase aus *Rhizopus delemar*, das α -1,4- und etwas langsamer α -1,6-Bindungen vom nichtreduzierenden Ende abspaltet⁴⁷⁾, gespalten. Pullulan nimmt hier eine Mittelstellung ein zwischen der Stärke, die allergrößtenteils 1,4-Bindungen enthält und daher schneller von Glucamylase ab-

gebaut wird, und dem Dextran, dessen 1,6-Bindungen nur sehr langsam gespalten werden. Ein für Pullulan spezifisches Enzym wurde von Wallenfels und Bender aus dem Bacterium Aerobacter aerogenes isoliert^{44,48}). Diese Pullulanase, die die α -1,6-Bindungen im Pullulan spaltet und somit dieses zu Maltotriose abbaut, zeigt dagegen bei Dextran keine Wirkung. Es scheint somit die spezielle Folge der α -1,6-verknüpften Maltose oder Maltotrioseeinheiten die notwendige Bedingung für ein Substrat dieses Enzyms zu sein.

Das Pullulan zeichnet sich weiterhin durch die Eigenschaft aus, beim Eintrocknen einer ca. 10%igen Lösung auf glatter Oberfläche durchsichtige Folien zu bilden^{37,49}). Diese Pullulanfolien sind weit besser wasserlöslich als solche aus Polyvinylalkohol; sie sind sauerstoffundurchlässig, bruchfest, gegen Öle und Fette beständig, schweißbar und überdies eßbar.

2.2. Vernetztes Pullulan

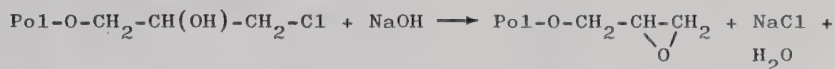
2.2.1. Bisherige Entwicklung

An Pullulanderivaten wurden bisher einige Ester und Äther dargestellt^{43,48-52}), unter denen die Methyläther besonders untersucht wurden^{53,54}). Diese Produkte sind jedoch im allgemeinen für chromatographische Trennmethoden ungeeignet. Denn chromatographische Trennmittel für Methoden mit fester

oder flüssiger stationärer Phase müssen unlöslich sein. Wenn sie als feste stationäre Phase wirken sollen, ist diese Bedingung evident; für eine flüssige stationäre Phase muß ein stabiler, quellfähiger Träger vorhanden sein, in dessen Innenraum sich die stationäre Phase ausbilden kann. Daher ist der Grad der Quellbarkeit (Wasser- bzw. Lösungsmittelrückhaltevermögen) ein wichtiges Maß für den Anwendungsbereich eines solchen Trennmittels. Als einziges Derivat dieser Gruppe wäre Carboxymethylpullulan ein potentielles Trennmittel für die Ionenaustauscherchromatographie; da es jedoch nur als freie Säure und auch da nur in ionenfreiem oder -armen Wasser fähig ist, stabile Gele zu bilden⁵²⁾, ist es nicht direkt einsetzbar, sondern müßte erst unlöslich gemacht werden. Weit vielversprechender wäre der Einsatz von vernetztem Pullulan. Aus Dextran, einem vorwiegend linearen, α -1,6-verknüpften Glucan, werden durch Vernetzung der Glucanketten mit Epichlorhydrin und anderen bifunktionellen Verbindungen quellfähige Gele mit Wasserrückhaltevermögen von 1-50 g Wasser/g Trockensubstanz hergestellt^{13,55-57)}. Entsprechend der Herstellung dieser "Sephadex"-typen sollte auch Pullulan zu einem quellfähigen Gel vernetzt werden.

2.2.2. Herstellung von Pullulangelen

Das Prinzip der Vernetzung von Dextran, nach dem auch Pullulan vernetzt werden sollte, ist folgendes: Beim Umsetzen einer stark alkalischen Polysaccharidlösung mit Epichlorhydrin werden die löslichen Polymerketten durch Glycerinätherketten verknüpft, indem das Epichlorhydrin mit zwei Hydroxylgruppen aus verschiedenen Ketten reagiert. Im Idealfall verläuft die Reaktion etwa nach folgendem Schema¹³⁾:
(Pol = Polysaccharid z.B. Dextran, Pullulan)



Natürlich sind auch eine Reihe von Nebenreaktionen möglich. Beispielsweise kann das Chlor im ECH in der wäßrigen Lauge hydrolysiert werden, wodurch das Epoxid nur noch mit einer Polymerkette reagieren kann. Es sind bisher an den Dextrangelen noch kaum analytische Untersuchungen hierüber gemacht worden. Die Abb.6 gibt einen Ausschnitt aus dem Polysaccharid-Glycerinäther-Netzwerk mit den zu erwartenden Strukturmerkmalen am Beispiel des Pullulan wider.

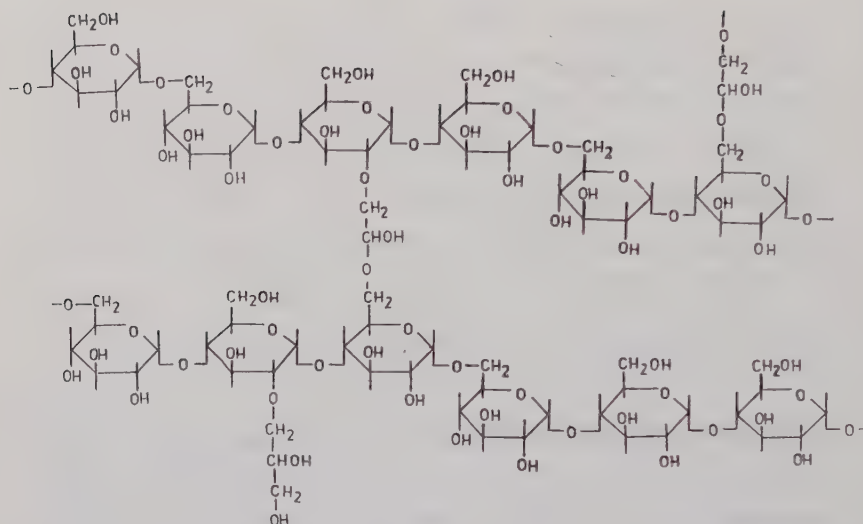


Abb.6: Ausschnitt aus der schematischen Struktur des mit Epichlorhydrin vernetzten Pullulan

Erste Schritte zur Herstellung von Pullulangelen waren bereits nach dem Verfahren von Grabert und Seide⁵⁸⁾ unternommen worden, bei dem das Vernetzungsmittel ECH gleichzeitig Lösungsmittel ist. Dieses Verfahren führte zu hochvernetztem Pullulan mit dem WRV von 1-3 g Wasser/g Trockensubstanz⁵²⁾. Bei Umsetzungen von Pullulan und Epichlorhydrin in DMSO mit Bariumhydroxid als Base waren auch Produkte mit

6-25 g Wasser/g Trockensubstanz WRV hergestellt worden⁵²⁾. Daher wurde zunächst dieser Weg weiter beschritten und das Verfahren optimiert. Es konnte eine Reihe verschieden stark vernetzter Pullulangele hergestellt werden. Da jedoch die Reinigung des so hergestellten Gels wegen der schlechten Löslichkeit des Bariumhydroxids und des hohen Siedepunktes des DMSO nur sehr schwer durchführbar ist, wurden andere Methoden zur Vernetzung des Pullulan untersucht. Hier bot sich vor allem das Verfahren zur Vernetzung des Dextran nach Flodin an⁵⁶⁾. Hierbei wird in Suspension in Toluol gearbeitet. Für Pullulan wurde dieser Weg ebenfalls beschritten und führte zu Produkten, die mit den in DMSO hergestellten vergleichbar waren und etwa das gleiche WRV hatten.

Um die Verwendung des teuren und auch gesundheitsschädlichen Lösungsmittels Toluol zu umgehen, wurden auch andere Lösungsmittel auf ihre Verwendbarkeit bei der Vernetzung des Pullulan untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß Pullulan, ähnlich wie Dextran¹³⁾, auch in wäßriger Lösung mit Epichlorhydrin zu gut quellbaren Gelen vernetzt werden kann. Es wurden Produkte mit WRV bis zu 26,5 g H₂O/g Trockensubstanz hergestellt. Da jedoch nach diesem Verfahren das Produkt nicht in Form von Gelkörnern anfällt, wie in der Suspensionsmethode, sondern als Gelblock, muß es zunächst zerkleinert und dann die Gelpartikel nach ihrer Größe "sortiert" werden. Eine Apparatur zur Separierung von Partikeln verschiedener Größe in einer Suspension wurde von Moore et al.

zum Flotieren von Ionenaustauscherharz gebaut^{59,60}). Da beim Pullulangel für die Flotation kein deionisiertes Wasser gebraucht wird, konnte eine entsprechend modifizierte Flotierapparatur mit Leitungswasser betrieben werden (s. Abb.26). Die Pullulangele wurden mit dieser Apparatur durch Variation der Durchflußgeschwindigkeit fraktioniert. Die feinkörnigste Fraktion (Durchflußgeschwindigkeit < 100 ml/min) und die grobkörnigste Fraktion (Durchflußgeschwindigkeit > 800 ml/min) wurden verworfen und mit der mittleren Fraktion die weiteren Untersuchungen durchgeführt.

2.2.3. Gelfiltration mit Pullulangelen

2.2.3.1. Theorie der Gelfiltration

Bereits Anfang der Fünfzigerjahre erkannte Smithies den Zusammenhang zwischen Gel-Konzentration, Molekülgröße und Wanderungsgeschwindigkeit bei der Elektrophorese in Stärkegelelen⁶¹), den er später quantitativ ermittelte⁶²). Unter sonst gleichen Bedingungen ist die Wanderungsstrecke eines Proteins der Stärkekonzentration umgekehrt proportional; es ließ sich ein Koeffizient definieren, der lediglich ein Maß für die Molekülgröße ist. Zur Erklärung dieses Phänomens benutzte Smithies ein Modell eines Gels mit thermisch bewegten Polysaccharidketten, die nur selten dem Molekül Poren zur Wanderung freigeben. Ein völlig anderes Modell stellte Tombs

auf⁶³⁾. Danach besteht ein Gel aus "starren" Poren von unterschiedlicher Größe. Für jedes Molekül gibt es eine "Grenzpore", durch die das Molekül gerade noch durchtreten kann. Die Beweglichkeit des Moleküls bei der Elektrophorese wird also durch die Anzahl der Poren, die größer sind als die Grenzpore, bestimmt. Gele bestehen definitionsgemäß⁶⁴⁾ aus zwei Komponenten, dem Gelbildner und dem Lösungsmittel. Beide durchdringen einander und sind in sich zusammenhängend. Die Kohärenz beider Systeme ist eine wesentliche Voraussetzung für eine Gelchromatographie. Denn ohne diese für das Dispersionsmittel wäre eine Migration der zu chromatographierenden Substanz nicht möglich, während die mangelnde Kohärenz des Gelgerüstes zu einer Suspension führen und damit alle gelösten Stoffe ungehindert durchlassen würde. Bei der Chromatographie an Gelen dringen gelöste Moleküle in die Poren des Gels ein. Je nach Verhältnis von Molekülgröße und Porenweite des Gels können sie verschieden stark in das Gel hineindiffundieren. Für jede Molekülgröße stellt sich also bei einem bestimmten Gel ein Diffusionsgleichgewicht ein. Moleküle oberhalb einer, für jedes Gel anderen Grenzgröße können überhaupt nicht in die Gelpartikel eindringen; sie halten sich im Lösungsmittelraum zwischen den Gelpartikeln und werden zuerst mit der dem "äußeren Volumen" (V_o) entsprechenden Lösungsmittelmenge eluiert. Mit abnehmender Molekülgröße können die Moleküle immer besser in das Gel hineindiffundieren und werden entsprechend stärker zurückgehalten. Dieser Vorgang ist schematisch in Abb.7. dargestellt.

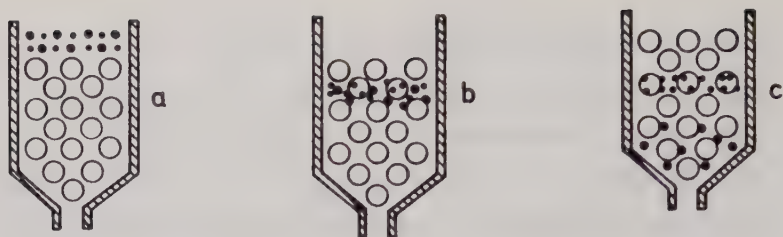


Abb.7: Schema der Gelchromatographie von zwei Molekülsorten in drei Phasen: a) unmittelbar nach dem Auftragen, b) nach dem Eindringen in das Gelbett, c) nach vollendeter Trennung

Die Komponenten eines Gemisches verlassen also bei der Gelchromatographie die Säule in umgekehrter Reihenfolge ihres Molekulargewichtes. Zur Beurteilung von Trennbereich und -leistung eines Gels ist die Kenntnis der Volumenverhältnisse in der Gelpackung notwendig. Das Gesamtvolumen der Gelpackung setzt sich zusammen aus dem Volumen der Gelmatrix (V_m) und aus den Lösungsmittelvolumina innerhalb und außerhalb der Gelpartikel (V_i und V_o), d.h. also der stationären und der mobilen Phase: $V_t = V_m + V_i + V_o$

Das Gesamtvolumen läßt sich aus dem Durchmesser der Säule sowie der Höhe der Gelpackung berechnen. Auch das Ausschlußvolumen läßt sich leicht bestimmen, da es das Volumen ist, mit dem ein hochmolekularer Stoff, dessen Molekülgröße oberhalb der Ausschlußgrenze des betreffenden Gels liegt, eluiert wird. Das innere Lösungsmittelvolumen schließlich kann einfach berechnet werden, wenn das Lösungsmittelaufnahmevermögen des Gels bekannt ist. Es gilt nämlich die Beziehung

$$V_i = \frac{a \cdot L}{S}$$

a = Einwaage an Trockengel
L = Lösungsmittelaufnahmevermögen
S = Dichte des Lösungsmittels

Ein Stoff, der in die Gelmatrix hineindiffundieren kann, aber ansonsten in keine weiteren Wechselwirkungen mit dem Gel tritt, wird mit einem Elutionsvolumen (V_e) eluiert, das größer als V_o , aber höchstens $V_o + V_i$ ist. Dieses Volumen wird erreicht, wenn die Moleküle frei in alle Teile des Gels diffundieren können.

2.2.3.2. Gelchromatographische Trennungen an Pullulangelen

Zur Charakterisierung von Pullulangelen als Trennmedium für die Gelchromatographie wurden einige von ihnen zur Säulenchromatographie von einer Reihe von Testproteinen benutzt. Aus der großen Anzahl von Proteinen, die als Standards für die Gelchromatographie benutzt werden, wurden drei gefärbte Proteine ausgewählt, um ihre Wanderung im Gel auch direkt beobachten zu können, nämlich Hämoglobin, Myoglobin und Cytochrom C; zur Verbreiterung des Molekulargewichtsspektrums wurde noch Chymotrypsinogen A sowie die besonders hochmolekulare β -Galaktosidase hinzugenommen. Das Ausschlussvolumen wurde mittels Dextranblau, einem angefärbten hochmolekularen Polysaccharid, bestimmt. Es zeigte sich, daß an Pullulangelen, ebenso wie an Dextrangelen Trennungen von Proteinen vorgenommen werden können, sofern die Molekulargewichtsunter-

schiede groß genug sind. Die folgende Abbildung zeigt das Elutionsdiagramm eines Gemisches von Dextranblau, Hämoglobin und Cytochrom C.

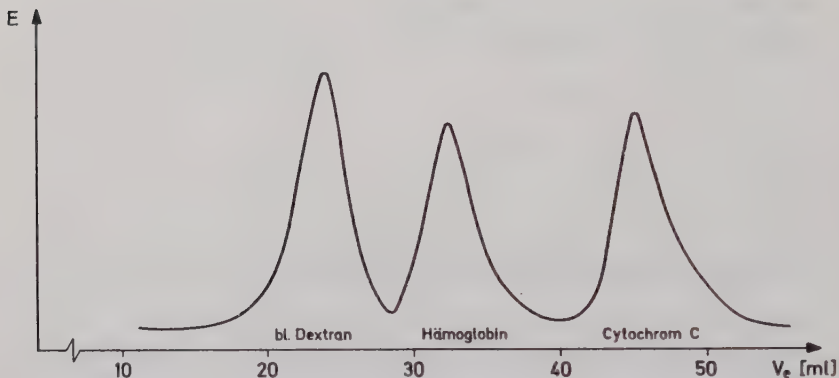


Abb.8: Chromatogramm eines Gemisches von Dextranblau, Hämoglobin und Cytochrom C an Pullulangel (WRV = 1⁴,1); Laufgeschwindigkeit 4 ml/h

Da die Proteine vollständig eluiert wurden, ist das verwendete Gel zu weiteren Trennungen benutzbar. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu zeigen, wurden solche Trennungen an verschiedenen Säulen durchgeführt.

Der Vergleich zwischen verschiedenen Säulen ist wegen der aus der Verschiedenheit der Gelpackungen resultierenden Unterschiede der Elutionsvolumina nicht direkt über diese möglich. Es müssen daher säulenunabhängige Elutionsparameter

eingeführt werden, die einen Vergleich ermöglichen.

Anstatt V_e wird daher im allgemeinen das Verhältnis V_e/V_o oder V_e/V_t benutzt. Als vorteilhafter hat sich jedoch V_e/V_o erwiesen, da es nicht nur von der Säulengeometrie sondern auch von der Dichte der Gelpackung unabhängige Werte liefert. Ein weiterer säulenunabhängiger Parameter ist der Verteilungskoeffizient (K_d). Er gibt an, wie stark eine bestimmte Substanz in das Gel hineindiffundieren kann und wird berechnet nach der Formel $K_d = (V_e - V_o)/V_i$. K_d liegt, falls keine Wechselwirkung zwischen der chromatographierten Substanz und dem Gel auftritt, zwischen 0 und 1. K_d ist null, wenn die Molekülgröße im Ausschlußvolumen liegt und eins, wenn das Molekül frei im Gel diffundieren kann. K_d -Werte über eins lassen auf Wechselwirkungen mit dem Gel schließen. Da V_i häufig nicht genau bekannt ist, wird anstatt K_d auch oft die leichter berechenbare Konstante K_{av} ⁶⁵⁾ verwendet, die aus $K_{av} = (V_e - V_o)/(V_t - V_o)$ berechnet wird. Je größer die Quellfähigkeit des Gels ist, desto kleiner wird der Unterschied zwischen K_d und K_{av} .

Die Parameter V_e/V_o und K_d der Testproteine an verschiedenen Säulen des gleichen Pullulangels zeigen eine recht gute Übereinstimmung und beweisen damit die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die Unterschiede bei V_e/V_o bewegen sich im Bereich um 10% und beim ungenauer bestimmbareren K_d bis ca. 20%.

Die Beziehung zwischen den Elutionsparametern und dem Molekulargewicht wurde aufgrund empirischer und theoretischer

Untersuchungen von verschiedenen Forschergruppen verschieden interpretiert. Im folgenden soll die Gültigkeit dieser Beziehungen, die an Dextransen im Bereich $(V_o + V_i) > V_e > V_o$ von Andrews⁶⁶⁾ bestätigt wurde, für Pullulangel festgestellt werden.

Die Whitaker'sche Beziehung⁶⁷⁾ zwischen Elutionsverhalten von Proteinen und ihrem Molekulargewicht $V_e/V_o = k_1 - k_2 \cdot \log M$ gilt, wie Abb.9 zeigt, auch bei Pullulangel (WRV = 14,1). Zum Vergleich wird in Abb.10 die entsprechende Abhängigkeit bei Sephadex G-100 und G-200 gegenübergestellt, Dextransen von ähnlichem Quellvermögen⁶⁸⁾.

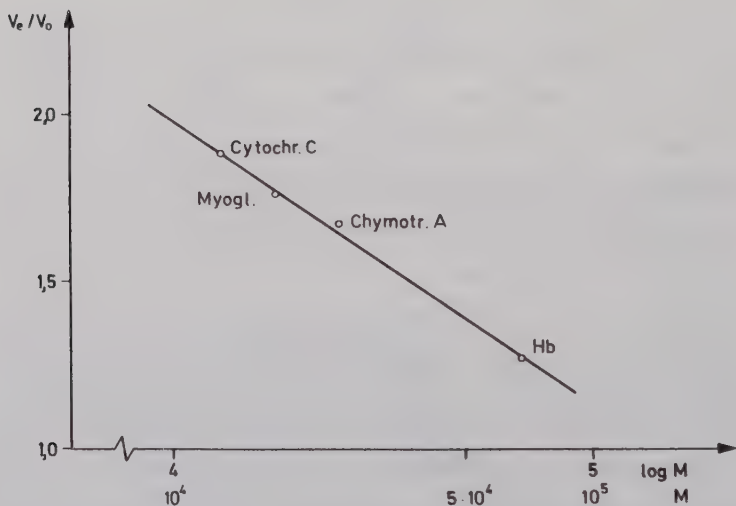


Abb.9: Abhängigkeit des Elutionsvolumens vom Molekulargewicht der Proteine Cytochrom C, Myoglobin, Chymotrypsinogen, Hämoglobin bei der Chromatographie an Pullulangel (WRV = 14,1)

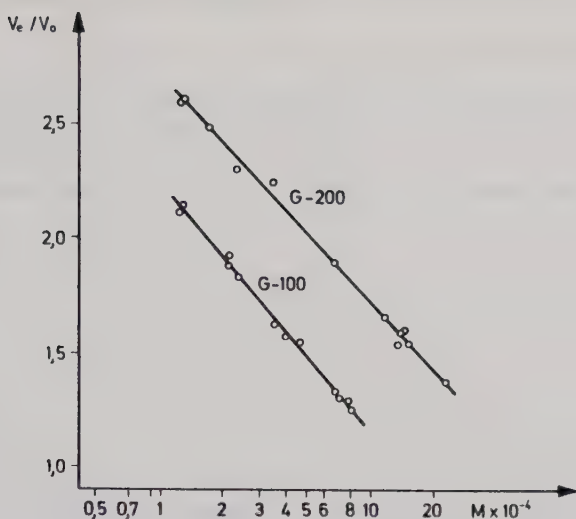


Abb. 10: Abhängigkeit des Elutionsvolumens vom Molekulargewicht verschiedener Proteine bei der Chromatographie an Sephadex G-100 und G-200 (nach Determann⁶⁸)

Der aus Abb. 9 bestimmten Whitaker'schen Beziehung bei diesem Pullulangel $\log M = 6,365 - 1,198 (V_e/V_0)$ sind die für die beiden Sephadextypen berechneten⁶⁷⁾ Beziehungen gegenübergestellt: G-100: $\log M = 5,941 - 0,847 (V_e/V_0)$

$$\text{G-200: } \log M = 6,698 - 0,987 (V_e/V_0)$$

Man sieht aus diesen Gleichungen das ähnliche Elutionsverhalten von Dextran- und Pullulangelen. Die etwas größere Steigung der Geraden bei Pullulangel deutet auf eine etwas geringere Trennleistung hin, da die Elutionsvolumina von

Molekülen gleicher Molekulargewichtsdifferenz etwas dichter beieinander liegen.

Zum Vergleich zu dieser Auftragsweise sei noch das Diagramm der von Squire⁽⁶⁹⁾ aufgrund theoretischer Berechnungen aufgestellten Beziehung $(V_e/V_o)^{1/3} = k_1 - k_2 \cdot M^{1/3}$ für Pullulangel dargestellt.

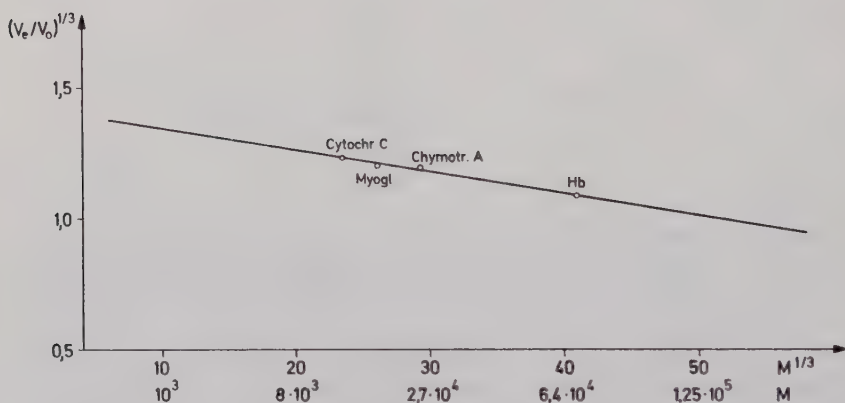


Abb.11: Abhängigkeit des Elutionsvolumens vom Molekulargewicht der Proteine Cytochrom C, Myoglobin, Chymotrypsinogen, Hämoglobin bei der Chromatographie an Pullulangel (WRV = 14,1)

Auch hier ergibt sich erwartungsgemäß eine lineare Beziehung, für die folgende Gleichung gilt:

$$M^{1/3} = 116,55 (V_e/V_o)^{1/3} - 167,36.$$

Für die Beziehung zwischen Verteilungskoeffizienten und Molekulargewicht stellte Ackers⁽⁷⁰⁾ aufgrund theoretischer Über-

legungen folgende Formel auf: $K_d = f(M^{1/3}/k)$. Um den Gebrauch dieser komplizierteren Funktion zu vermeiden, wird jedoch häufiger die von Wieland et al.⁷¹⁾ gefundene empirische Beziehung $K_d^{1/3} = k_1 - k_2 \cdot M^{1/2}$ verwendet.

Auch die Gültigkeit dieser Beziehung konnte für Pullulangel bestätigt werden.

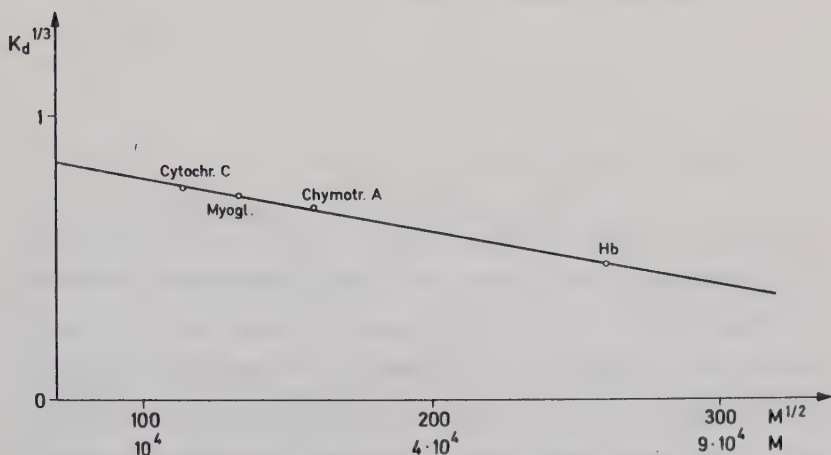


Abb. 12: Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten vom Molekulargewicht der Proteine Cytochrom C, Myoglobin, Chymotrypsinogen, Hämoglobin bei der Chromatographie an Pullulangel (WRV = 14,1)

Es gilt hier die Gleichung $M^{1/2} = 521,196 - 543,479 \cdot K_d^{1/3}$.

Wie also die vorstehende Auswertung der Gelchromatographie zeigt, lassen sich an Gelen aus vernetztem Pullulan nicht nur Proteine verschiedenen Molekulargewichts voneinander trennen, sondern nach einer entsprechenden Eichung auch

deren Molekulargewichte bestimmen. Hierbei dürften die beiden Auswertemethoden, die auf der V_e/V_o -Bestimmung basieren, am günstigsten sein, da hier, wie bereits gezeigt wurde, der Fehler geringer ist, als bei der K_d -Messung.

Dies sollte natürlich wegen der Gültigkeit der gleichen Beziehungen auch bei Polysacchariden, wie von Granath und Flodin⁷²⁾ sowie Porath⁷³⁾ gezeigt wurde, und anderen makromolekularen Substanzen möglich sein.

2.2.4. Folien aus vernetztem Pullulan

Wie bereits früher erwähnt, kann Pullulan beim Eintrocknen einer konzentrierten Lösung auf glatter Oberfläche durchsichtige Folien bilden³⁷⁾. Da es sich zeigte, daß auch beim Eintrocknen von Gelen aus vernetztem Pullulan Folien entstehen können, wurde eine Reihe von Pullulanfolien hergestellt und diese näher untersucht. Die Herstellung dieser Folien erfolgte durch Ausstreichen einer Gelsuspension auf verschiedenen glatten Flächen. Als geeignete Unterlagen erwiesen sich vor allem wasserabstoßende Kunststoffe wie Polyäthylen und Polyvinylchlorid, während metallische Flächen weniger brauchbar waren, da sich die Pullulanfolien von ihnen nur schlecht (verchromtes Blech) oder gar nicht (Aluminiumfolie) lösten. Folien aus vernetztem Pullulan sind auch ohne Weichmacherzusatz elastisch und können gebogen oder gefalzt werden. Dagegen reißen sie leicht unter Zugspannung.

Da diese Folien nicht aus einer homogenen Lösung, sondern aus einer Suspension von Gelpartikeln hergestellt werden, sind sie nicht vollkommen durchsichtig sondern leicht trüb. Sie können bei Benetzung wieder vollständig aufquellen und anschließend von neuem zu Folien eingetrocknet werden. Daher bietet sich ihre Verwendung als stationäre Phase für die Dünnschichtchromatographie oder für die Elektrophorese an, Das eingetrocknete Gel kann zur Dokumentation des Ergebnisses aufbewahrt werden.

2.2.5. Elektrophorese in Pullulangelen

Unter Elektrophorese³⁶⁾ versteht man die Wanderung von in Lösung befindlichen, elektrisch geladenen Teilchen unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes. Die Wanderung ist abhängig von den Eigenschaften des Teilchens, von den Eigenschaften des das Teilchen umgebenden Milieus, von der Stärke des angelegten elektrischen Feldes und von der Zeit. Elektrophorese wird zur Trennung von Substanzgemischen, vor allem von Proteinen verwendet. Voraussetzung für diese Methode ist die gute Löslichkeit der Substanzen im Elektrolytmedium und die elektrische Ladung der Teilchen. Um eine hinlänglich gute Trennung zu erreichen, müssen sich die Substanzen hinsichtlich ihrer Wanderungsrichtung oder -geschwindigkeit unterscheiden. Letztere wird durch das Trägermaterial wesentlich beeinflusst.

Als Trägermaterial für die Elektrophorese können Papier oder Celluloseacetat, aber auch die meisten in der Dünnschichtchromatographie gebräuchlichen Trägermaterialien und eine Reihe weiterer Gele verwendet werden³⁶⁾. An Trägermaterialien auf Polysaccharidbasis fanden bisher vor allem Cellulosepulver⁷⁴⁾, Stärke⁶¹⁾ und Agar-Gel⁷⁵⁾ sowie das Dextrangel Sephadex⁸⁾ Verwendung.

Um die prinzipielle Verwendbarkeit von Pullulangel für die Elektrophorese zu beweisen, wurde ein Gemisch aus zwei Proteinen elektrophoretisch aufgetrennt. Als Trägermaterial wurde eine wiedergequollene Folie aus vernetztem Pullulan mit einem Wasserrückhaltevermögen von 23 g H₂O/g trockenes Gel verwendet. Abb.13 zeigt die Auftrennung von Hämoglobin und Cytochrom C.

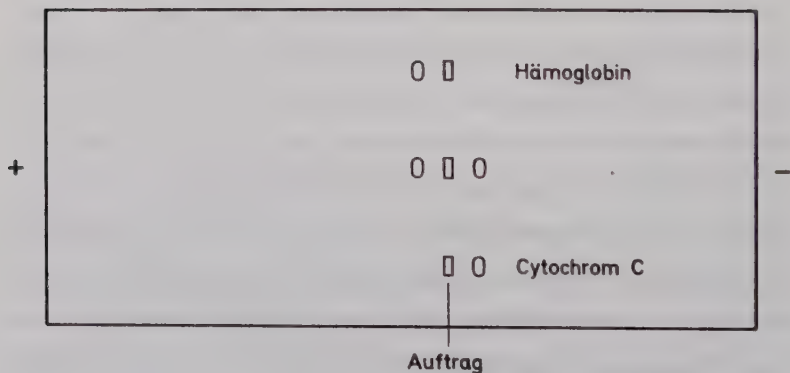


Abb.13: Elektrophoretische Trennung von Hämoglobin und Cytochrom C an Pullulangel. Puffer 0,1M Glycin/NaOH pH 9,6, 250 V, 40 mA, Laufzeit 120 Minuten

Als besonderer Vorzug dieses Trägermaterials erwies sich, daß es nach dem Gebrauch wieder zu einer Folie eingetrocknet werden konnte, die ohne Schwierigkeiten über viele Monate aufbewahrt werden kann.

2.3. Hochquellbares Pullulangel

Bei der Vernetzung des Pullulan mit Epichlorhydrin scheint bei etwa 30 g Wasser/g trockenes Gel eine obere Grenze der Quellfähigkeit zu liegen, da bei einer weiteren Senkung des Vernetzungsgrades kein stabiles Gel entsteht. Daher sollten andere Methoden untersucht werden, um ein höher quellbares Pullulangel herzustellen. Einer amerikanischen Forschergruppe war es kürzlich gelungen, durch Pfropfpolymerisation an Stärke ein Produkt herzustellen, das bis zum Tausendfachen seines Eigengewichtes an Wasser binden kann^{76,77}). Dieser "Super Slurper" wird durch Pfropfpolymerisation von Acrylnitril an Stärke und deren anschließende partielle Hydrolyse hergestellt. Er ist zwar in der Lage, 600-900 g destilliertes Wasser/g Trockensubstanz zu absorbieren, doch sinkt diese immense Absorptionsfähigkeit beim Zusatz von Ionen sehr schnell. So kann es nur noch etwa 60 g eines simulierten Urins (1,94 % Harnstoff, 0,8 % NaCl, 0,11 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,06 % CaCl_2 und 97,09 % H_2O) pro g Trockensubstanz binden. Ein nach der gleichen Methode hergestelltes Pfropfpolymeres des Pullulan ist in der Lage, etwa das 400-fache seines Eigengewichtes an

destilliertem Wasser zu binden, jedoch sinkt auch hier die Absorptionsfähigkeit mit der Zunahme der Ionenstärke schnell ab. Abb. 14 zeigt die Abhängigkeit des Wasseraufnahmevermögens vom Salzgehalt des Wassers.

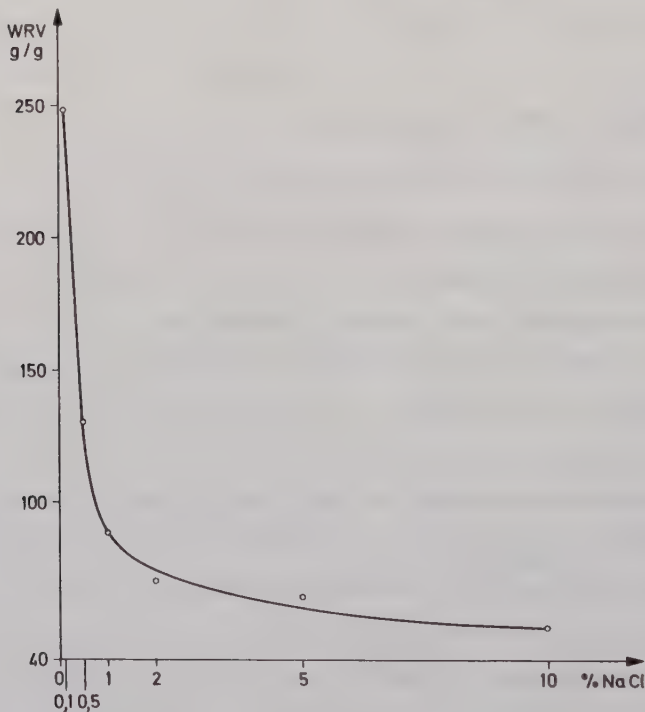


Abb. 14: Abhängigkeit der Quellfähigkeit von Pullulan-Acrylamid/Kaliumacrylat-Copolymerisat vom Salzgehalt des Wassers.

Beim hohen Quellungsgrad dieses Pullulan-Polyacrylamid-acrylat-Gels ist es leicht einzusehen, daß es wegen der leichten Verformbarkeit durch Druck nicht als Säulenmaterial für die

Gelchromatographie geeignet ist. Als Anwendungsgebiet käme z.B. die Medizin in Frage, wo heute immer mehr Mittel in Gel-form verabreicht werden. Wegen der guten Transparenz und des hohen Wasseraufnahmevermögens böte sich die Verwendung als Brandwundenverband an, da doch gerade in diesem Bereich derzeit die Verwendbarkeit gut quellfähiger Gele auf Polysaccharidbasis untersucht wird⁷⁸⁾. Hier weitere Untersuchungen zu machen, hätte jedoch den Rahmen dieser Arbeit gesprengt.

2.4. Mercaptoäthyl- und Aminoäthylpullulan

Um Pullulan auch als Trägermaterial für die Affinitätschromatographie²⁸⁾ verwenden zu können, sollten reaktive funktionelle Gruppen an Pullulan fixiert werden. Hier kamen unter anderem Amino- und Mercaptogruppen in Frage, da an diese leicht andere Substituenten kovalent gebunden werden können. Als erfolgversprechendster Weg bot sich die Einführung von Amino- und Mercaptoäthylgruppen an. Über die Aminoäthylierung von Polysacchariden, besonders von Cellulose liegt bereits eine Reihe von Veröffentlichungen vor. Neben der Umsetzung der Cellulose mit Acrylamid⁷⁹⁾ wurde vor allem die Reaktion mit Äthylenimin angewendet. Diese kann sowohl mit Äthylenimindampf, wo nur gering substituierte Produkte erhalten werden⁸⁰⁾, als auch in verdünnter Lösung oder in flüssigem Äthylenimin durchgeführt werden, wobei bei letzterer Methode sehr stark substituierte Produkte mit längeren Polyäthylen-

iminketten entstehen^{81,82)}. Die Reaktion in Äthyleniminlösung findet bei Temperaturen über 100°C oder unter Zusatz von Katalysatoren bei Temperaturen um 80°C statt^{80,82)}. Um nicht bei zu hohen Temperaturen arbeiten zu müssen, wurde die Umsetzung von Pullulan mit Äthylenimin in Toluol unter Verwendung von Benzylchlorid oder Epichlorhydrin als Katalysator durchgeführt. Es wurden Produkte mit Stickstoffgehalten zwischen 1 % und 10 % erreicht, was Substitutionsgraden von 0,1 bis 1,8 Aminoäthylgruppen/Anhydroglucose entspricht. Diese Aminoäthylpullulane sind leicht gelblich gefärbte Substanzen, deren Quellfähigkeit in Wasser mit dem Substitutionsgrad abnimmt. Thiolgruppen wurden bereits häufiger in Polysaccharid-gele, besonders zum Zweck der kovalenten Chromatographie eingeführt. An CNBr- oder Epoxid-aktivierte Sepharose wurden Glutathion³³⁾, an Protein gebundenes 3-Carboxy-4-nitrobenzothiol⁸²⁾, S-Hydroxypropyl-thiosulfid sowie Cystein und Cystinderivate⁸⁵⁾ eingeführt und anschließend nötigenfalls zum Thiol reduziert. Alle diese Methoden erfordern mehrere Reaktionsschritte. So war es interessant zu untersuchen, ob sich Thiolgruppen nicht auch in einer einstufigen Reaktion in ein Polysaccharid einführen lassen. Es wurde also analog zur Aminoäthylierung versucht, mittels Äthylensulfid Mercaptoäthylgruppen in Pullulan einzuführen, was mit recht gutem Erfolg gelang. Es konnten Pullulanderivate mit Schwefelgehalten zwischen 2 % und 20 % hergestellt werden, was Substitutionsgraden zwischen 0,15 und 1,6 Mercaptoäthylgruppen/Anhydroglucose entspricht. Mercaptoäthylpullulane sind weiße Substanzen, die

bei geringen Substitutionsgraden ($DS < 0,2$) wasserlöslich, bei mittleren Substitutionsgraden ($0,2 < DS < 1$) in Wasser quellbar und bei höherem Substitutionsgrad wasserunlöslich und wenig quellbar sind. Als Ausgangsprodukte für Trägermaterialien für die Affinitätschromatographie oder die kovalente Chromatographie sollten daher vor allem Produkte mit Substitutionsgraden unter 1 in Frage kommen.

3. Produkte aus verflüssigter Stärke und ihre Anwendung

3.1. Klebsiella-verflüssigte Stärke

Schon bei den ersten Versuchen, eine Amylase aus *Bacillus macerans* zu isolieren, wurde deren Eigenschaft, die Viskosität von Stärkelösungen herabzusetzen, beobachtet⁸⁶⁾. Dieses Enzym, das von French und Mitarbeitern als Cyclodextrin-glucanotransferase charakterisiert wurde⁸⁷⁾, scheint neben α -1,4-Transfer von Glucanen zu linearen und cyclischen Produkten auch zur Hydrolyse von α -1,4-Glucanen in der Lage zu sein. Diese hydrolytische Aktivität ist entgegen früheren Veröffentlichungen^{88,89)} nach neuesten Ergebnissen auch nach der Reinigung der Macerans-CGT noch vorhanden⁹⁰⁾. Eine solche hydrolytische Aktivität, die zur schnellen Verflüssigung gelatinierter Stärke führt, scheint auch eine CGT aus *Klebsiella pneumoniae* zu besitzen, die in jüngerer Zeit isoliert wurde⁹¹⁾. Die Struktur der bei der Verflüssigung von Stärke durch *Klebsiella*-CGT entstehenden Produkte ist noch nicht bekannt.

Trotzdem sollte diese verflüssigte Stärke anstelle von nativer Stärke als Ausgangsprodukt für stabile Stärkegele verwendet werden, da sie aufgrund ihrer besseren Löslichkeit leichter chemisch modifiziert werden kann und weil sie wegen des geringeren Polymerisationsgrades zu Produkten mit kleinerer Partikelgröße und damit eventuell zu besserer Trennschärfe führen kann.

3.2. Herstellung und Eigenschaften von Gelen aus verflüssigter Stärke

Ähnlich der Vernetzung des Pullulan wurde auch verflüssigte Stärke mit Epichlorhydrin in wäßriger Natronlauge vernetzt. Die Produkte mußten nach der Zerkleinerung ebenfalls durch Flotieren nach der Partikelgröße aufgetrennt werden. Die Quellfähigkeit der Stärkegele ist geringer als die der entsprechenden Pullulangele, das Wasserrückhaltevermögen liegt zwischen 2,5 und 5,2 g H_2O /g Trockensubstanz und erreicht damit höchstens $1/5$ des maximalen Wertes bei Pullulangelen. Der Grund hierfür liegt wohl in der kürzeren Kettenlänge des Polysaccharids.

Die geringere Quellfähigkeit und damit die geringere Größe der Hohlräume in der Gelmatrix bei diesem Stärkegel läßt erwarten, daß an diesem Gel kleinere Moleküle als am Pullulangel aufgetrennt werden können. Es wurde daher eine Reihe von Testsubstanzen über eine Säule mit Stärkegel ($WRV = 5,2$) ge-

schickt. Wie zu erwarten war, wurden die größeren Moleküle, d.h. alle verwendeten Proteine ($M \geq 13000$) mit dem Ausschlußvolumen V_0 eluiert. Wie das Elutionsdiagramm (Abb.15) zeigt, konnte jedoch ein Gemisch aus Oligosacchariden aufgetrennt werden.

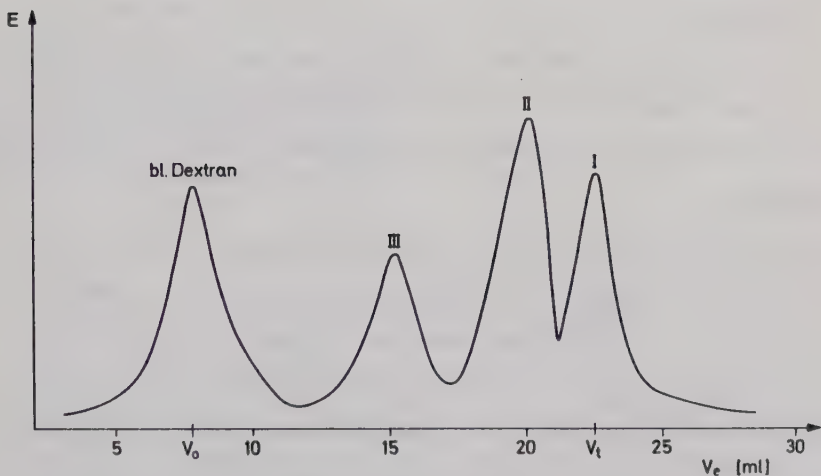


Abb.15: Trennung von Pullulanspaltprodukten an Stärkegel (WRV = 5,2), Säule 1 cm x 30 cm, Laufgeschwindigkeit 30 ml/h

Hierbei ist zu beachten, daß Maltotriose (I) mit dem Gesamtvolumen der Gelpackung eluiert wird, was bedeutet, daß es wegen der Kleinheit des Moleküls frei in alle Teile des Gels diffundieren kann. Die größeren Oligosaccharide, Maltotriosylmaltotriose (II) und ein größeres Pullulanspaltprodukt (III) können jedoch nur partiell in das Gel eindringen; ihr Elutions-

volumen liegt daher in dem für eine Trennung interessanten Bereich zwischen V_o und V_t . Es sei noch angemerkt, daß auch aus diesem Gel Folien hergestellt werden konnten.

Um neben diesen wenig quellbaren Stärkegelen auch ein hochquellbares zu erhalten, wurde wie bereits auch bei Pullulan nach der "Super-Slurper"-Methode⁷⁶⁾ ein Pfropfcopolymerisat der verflüssigten Stärke hergestellt. Dieses Polyacrylamid-Acrylat-Stärke-Copolymere ist ebenfalls ein extrem quellbares Gel, dessen Wasserrückhaltevermögen über 300 g H_2O /g Trockensubstanz liegt. Die Quellfähigkeit des Gels ist, wie Abb.16 zeigt, ebenfalls stark von der Ionenkonzentration des Wassers abhängig.

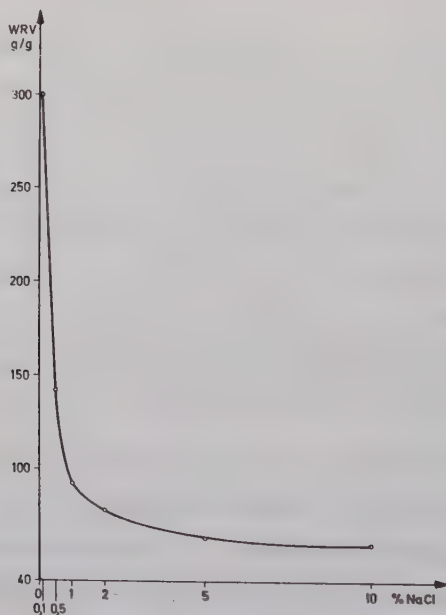


Abb.16: Abhängigkeit der Quellfähigkeit vom Salzgehalt des Wassers bei Stärke-Acrylamid-Acrylat-Copolymerisat

Wegen der leichten Verformbarkeit unter Druck ist es als Säulenmaterial für die Gelchromatographie wohl ebenso wenig verwendbar, wie das entsprechende Pullulangel. Sein möglicher Anwendungsbereich dürfte, wie auch bei diesem, im Bereich der Pharmazie liegen.

4. Derivate von α -Cyclodextrin (Cyclohexaamylose) und ihre Anwendung

4.1. α -Cyclodextrin und seine Eigenschaften

Cyclodextrine, auch bekannt unter den Namen Cycloamylosen und Schardinger-Dextrine nach ihrem Entdecker Franz Schardinger⁹²⁾, sind eine Gruppe von homologen Oligosacchariden, die durch den Stärkeabbau durch eine Amylase aus *Bacillus macerans* entstehen, einem Mikroorganismus der ebenfalls von Schardinger entdeckt wurde⁹³⁾. Sie bestehen aus cyclischen Molekülen, die aus jeweils 6 oder mehr α -1,4-verknüpften Glucoseeinheiten aufgebaut sind⁹⁴⁾. Abb.17 zeigt die Strukturformel und das Kalottenmodell⁹⁵⁾ des kleinsten Gliedes dieser homologen Reihe, der Cyclohexaamylose.

Diese Struktur, die vor allem von Freudenberg^{96,97)} und French^{98,99)} aufgeklärt wurde, weist den Cyclodextrinen eine Sonderstellung unter den Kohlenhydraten zu. Infolge ihrer cyclischen Struktur besitzen sie weder ein reduzierendes noch ein nichtreduzierendes Ende. Sie sind sehr stabil, werden von

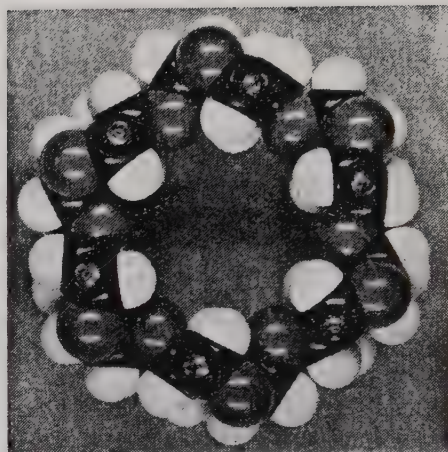
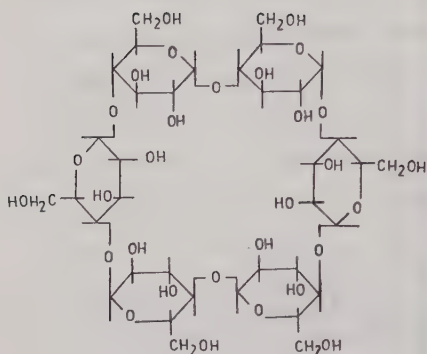


Abb.17: α -Cyclodextrin (Cyclohexaamylose)
Strukturformel und Kalottenmodell⁹⁵⁾

heißer wäßriger Alkalilösung nicht abgebaut und sind auch gegen wäßrige Säure und gegen die gewöhnlichen stärkeabbauenden α -Amylasen recht beständig, während sie von β -Amylasen überhaupt nicht angegriffen werden^{99,100)}. Sie kristallisieren gut aus Wasser und aus Wasser/Alkohol-Gemischen⁹⁴⁾. Die Struktur des kristallinen α -Cyclodextrinhexahydrat, bei dem sich zwei Wassermoleküle im Inneren des α -CD-Rings und die vier anderen außerhalb befinden, wurde von Sängler et al. aufgeklärt¹⁰¹⁾. Der Cyclodextrinring ist bei diesem Komplex stark deformiert, eine Tatsache, die auch an im Wasser gelösten α -CD beobachtet wurde¹⁰²⁾. Die Ursache für diese Deformation, bei der ein Glucoserest in den Ring hineinragt, dürfte

in der Kleinheit der Wassermoleküle liegen, an die der Innenraum des Rings angepaßt werden muß, damit sich noch Wasserstoffbrücken ausbilden können. Für diese Annahme spricht auch, daß bei Einschlußkomplexen mit größeren Molekülen der α -CD-Ring kaum deformiert ist^{103,104)}.

Diese Fähigkeit, mit einer großen Anzahl von organischen und anorganischen Verbindungen Einschlußkomplexe zu bilden, ist eine der herausragendsten Eigenschaften der Cyclodextrine.

Auf dieser Eigenschaft beruht auch ihre spezifische katalytische Wirkung bei einer Reihe von organischen Reaktionen, die ihnen Modellcharakter für enzymatische Reaktionen gibt¹⁰⁵⁻¹⁰⁸⁾.

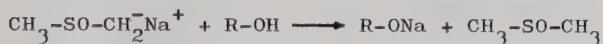
Es sind insbesondere eine Anzahl spezifischer aromatischer Substitutionen untersucht worden, z.B. die Chlorierung von Anisol, die bei genügender α -CD-Konzentration zu über 95 % p-Chloranisol führt^{109,110)}. Die einzelnen Cyclodextrine werden durch Voranstellen eines griechischen Buchstabens charakterisiert. So besteht α -Cyclodextrin aus 6 Glucoseeinheiten, β -CD aus 7, γ -CD aus 8 und so fort.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur mit α -Cyclodextrin gearbeitet; daher wird im folgenden auch nur noch auf spezielle Eigenschaften und Derivate dieser Cyclohexaamylose eingegangen. Es ist eine große Anzahl von Cyclodextrinderivaten in der Literatur beschrieben¹¹¹⁾, unter denen die durch teilweise oder vollständige Veresterung oder Verätherung der Hydroxylgruppen dargestellten die interessantesten sind.

4.2. Carboxymethylcyclodextrin

α -Cyclodextrin besitzt, verglichen mit den anderen in dieser Arbeit untersuchten Glucanen, nur eine verhältnismäßig geringe Wasserlöslichkeit. So lösen sich in Wasser bei Raumtemperatur nur ca. 10 g α -CD/100 ml Wasser¹¹²⁾. Diese Löslichkeit kann zwar durch die Gegenwart mancher Verbindungen, mit denen α -CD Komplexe bildet, erhöht werden, wie am Beispiel des α -CD-p-Nitrophenylglucosidkomplexes gezeigt wurde¹¹³⁾. Jedoch sinkt sie in Gegenwart einer großen Zahl organischer aber auch anorganischer Verbindungen, mit denen α -CD Einschlußkomplexe bildet, noch beträchtlich oft bis nahezu Null herab^{114,115)}. Deshalb sind in der Vergangenheit bereits einige gut wasserlösliche Cyclodextrinderivate hergestellt worden. Neben nur geringfügig mit Epichlorhydrin substituiertem Cyclodextrin¹¹⁶⁾, wurden die Natriumsalze des Cyclodextrin-Sulfopropyläthers und des -Carboxymethyläthers¹¹⁷⁾ hergestellt. Die Löslichkeitseigenschaften dieser Cyclodextrinderivate und einer Reihe ihrer Einschlußkomplexe wurden eingehend untersucht¹¹⁸⁻¹²⁰⁾. Sie alle sind weit besser wasserlöslich als das unsubstituierte α -CD und seine Einschlußverbindungen. Die Herstellung des Carboxymethylcyclodextrins erfolgte in diesen Arbeiten durch Einwirkung von Chloressigsäure auf α -CD in wäßriger Alkalilösung und führte zu Produkten mit Substitutionsgraden um 3 Carboxymethylgruppen/Cyclodextrin¹¹⁷⁾. Um höher substituierte Carboxymethylcyclodextrine zu erhalten, wurde nun eine bei der Carboxymethylierung des Pullulan⁵²⁾ bereits erfolgreich benutzte Methode auch bei α -CD angewendet. Diese Carb-

oxymethylierung wurde in DMSO mit Natriumchloroacetat und Methylsulfinylmethylcarbanion, das nach dem Verfahren von Hakomori¹²¹⁾ durch Einwirkung von Natriumhydrid auf DMSO hergestellt wurde, als Base durchgeführt. Der Reaktionsablauf ist in den folgenden Gleichungen dargestellt:



Es konnten Substitutionsgrade von 1 bis 1,6 CM-Gruppen pro Anhydro-Glucose erreicht werden, was 6-10 CM-Gruppen/CD entspricht. Diese Produkte sind sehr gut wasserlöslich und können auch durch Einschlußkomplexbildner nicht ausgefällt werden.

4.3. Hydroxyäthylcyclodextrin

4.3.1. Darstellung von HÄ-α-CD

Als weiteres hydrophiles Derivat des Cyclodextrin bot sich der Hydroxyäthyläther an. Gerade in den letzten Jahren wurden Hydroxyäthyläther der Stärke besonders für die Verwendung als Blutplasmaersatz hergestellt und eingehend beschrieben¹²²⁻¹²⁴⁾. Es hat sich gezeigt, daß bei der Einwirkung von Äthylenoxid auf Stärke in wäßriger Alkalilösung nach einer ersten Additionsreaktion an einer der drei möglichen Hydroxyl-

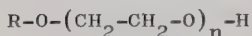
gruppen der Anhydroglucose nach dem Schema:



die nächste Addition nicht nur an einer der beiden noch verbliebenen ursprünglichen Hydroxylgruppen, sondern auch an der neugebildeten Hydroxyäthylgruppe wie folgt stattfinden kann¹²²⁾



Dies kann bei hohen Substitutionsgraden zu langen Polyäthylenoxidketten mit folgender Struktur führen:



Die Substituentenverteilung bei den Hydroxyäthylstärken wurde erst in neuerer Zeit eingehender untersucht¹²⁵⁾. Sie führte zu dem interessanten Ergebnis, daß die Addition des Äthylenoxids zunächst bevorzugt an der Hydroxylgruppe des C2-Atoms der Anhydroglucose stattfindet. Bei der Monosubstitution ist der Substituent zu etwa 80 % am C2 und nur zu etwa je 10 % am C3 und C6. Bei höheren Substitutionsgraden bilden sich bevorzugt Oligo- und Polyäthylenoxidketten.

Die Hydroxyäthylierung des Cyclodextrin wurde analog dem beschriebenen Verfahren zur Hydroxyäthylierung der Stärke durchgeführt. Der durchschnittliche Substitutionsgrad des erhaltenen Produktes ist etwa 1 Hydroxyäthylgruppe/Cyclodextrin. Um den Grad der Uneinheitlichkeit dieses Monohydroxyäthylcyclodextrins festzustellen, wurde es dünnschichtchromatographisch überprüft. Abb.18 zeigt das Chromatogramm.

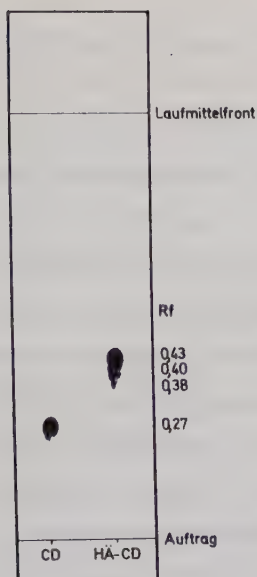


Abb.18:

Dünnschichtchromatogramm
von α -Cyclodextrin und
Hydroxyäthyl- α -Cyclo-
dextrin;
Laufmittel: i-Propanol/
Äthanol/Wasser 28:56:16
(v/v/v)

Das Produkt besteht also aus drei Substanzen, die sich bezüglich ihrer Rf-Werte in diesem, wie auch anderen verwendeten Laufmitteln nur so geringfügig unterscheiden, daß eine chromatographische Trennung praktisch unmöglich ist. Diese drei Produkte, die sich auch in ihren Löslichkeitseigenschaften nicht unterscheiden, dürften die drei möglichen Monosubstitutionsprodukte des α -CD sein. Da keine Möglichkeit zur Trennung dieser Hydroxyäthylcyclodextrine gefunden wurde, wurde im folgenden mit dem Gemisch weitergearbeitet. Monohydroxyäthylcyclodextrin ist sehr gut wasserlöslich, ebenso wie eine ganze Anzahl von seinen Einschlußkomplexen.

Mit Jod (J_2/KJ) bildet es einen in rotbraunen Blättchen kristallisierenden Einschlußkomplex mit 0,75 Mol Jod/Mol Cyclodextrin. Das Molverhältnis ist also deutlich niedriger als

beim α -Cyclodextrin-Jodkomplex, wo unter denselben Bedingungen 1,15 Mol J_2 /Mol α -CD eingeschlossen werden¹¹⁵⁾. Der J_2 /KJ-Komplex in α -Cyclodextrin besteht entweder aus Ketten, die aus J_3^- - und J_2 -Einheiten aufgebaut sind, oder Polyanionen der Struktur $(J_2 \dots J \dots J_2)_n$ ¹²⁶⁾; diese Ketten liegen in Kanälen der Kristallmatrix¹²⁷⁾. Für die schwarzblaue Farbe dieses α -CD-Jodkomplexes sind die langen Polyjodidketten verantwortlich¹²⁸⁾. Die Färbung des Jodkomplexes des Hydroxyäthylcyclodextrins läßt darauf schließen, daß hier das Jod in kürzeren Einheiten eingeschlossen wird. Dies deutet darauf hin, daß der Jodkomplex des HÄ- α -CD nicht eine Kanalstruktur besitzt, sondern eine Käfigstruktur, wie sie die Einschlußkomplexe kleinerer Moleküle in Cyclodextrin haben¹²⁹⁾.

Um festzustellen, inwieweit Hydroxyäthylcyclodextrin von CD-abbauenden Enzymen angegriffen wird, wurde es mit einer Cyclodextrin-Glucanotransferase aus *Klebsiella pneumoniae*⁹¹⁾ inkubiert. Auch bei hohen Enzymkonzentrationen und langen Reaktionszeiten trat kein merklicher Abbau ein. Es ist also bereits dieses nur wenig substituierte Cyclodextrin kein Substrat mehr für ein solch spezifisches Enzym.

4.3.2. Methyliertes Hydroxyäthyl- α -cyclodextrin

Methyläther sind wohl die am häufigsten hergestellten Derivate von Kohlehydraten. Insbesondere bei der Strukturaufklärung von Oligo- und Polysacchariden spielen O-Permethyl-Kohlenhydrate eine wesentliche Rolle¹³⁰⁾. So wurden auch von den Cyclodextrinen Derivate verschiedenen Methylierungsgrades hergestellt und eingehend untersucht¹³¹⁾. Die Darstellung des Dimethylproduktes (DS bezogen auf Glucose $\hat{=}$ DS = 12 Methyl/ α -CD) mit Dimethylsulfat in DMSO/DMF analog zur Permethylierung der Stärke¹³²⁾ und des Trimethylproduktes ($\hat{=}$ DS = 18 Methyl/ α -CD) mit Methyljodid in DMF sind eingehend beschrieben¹³³⁾. Es zeigte sich, daß die katalytische Selektivität des partiell methylierten α -Cyclodextrins (DS/CD = 12) bei der Chlorierung von Anisol noch größer ist, als des nativen α -CD¹³³⁾. Da hier die Methoxygruppen am C2 und C6 sind, kann man aus diesem Ergebnis schließen, daß für die Stabilität des Einschlußkomplexes und damit für die katalytische Aktivität die Hydroxylgruppe am C3 verantwortlich ist. Die Tatsache, daß auch Methylcyclodextrine noch katalytisch aktiv wirken können, führt zu einigen neuen Aspekten ihrer Anwendung. Denn mit dem Methylierungsgrad nimmt die Löslichkeit in einer Reihe von organischen Lösungsmitteln zu; so ist z.B. Dimethyl- α -CD gut in Chloroform löslich¹³¹⁾. Durch Methylcyclodextrine könnte also ein neues Gebiet katalysierter Reaktionen in vielen organischen Lösungsmitteln erschlossen werden.

Wie auch schon α -CD permethyliert worden ist¹³¹⁾, wurde das

HÄ- α -CD methyliert. Da die einfache Methylierung nur zum Dimethylprodukt (bez. auf Glucose) führte, wurde nach dem gleichen Verfahren nachmethyliert und so ein nahezu vollständig methyliertes Produkt hergestellt. Beide O-Methylhydroxyäthyl- α -cyclodextrine sind in Chloroform gut löslich, dagegen ist die Wasserlöslichkeit besonders beim Permethyloprodukt nur noch gering. Jodeinschlußkomplexe konnten von den Methylhydroxyäthylcyclodextrinen nicht hergestellt werden.

4.3.3. Vernetztes Hydroxyäthylcyclodextrin

Für manche Verwendungszwecke ist es nützlich, Cyclodextrin durch Polymerisation unlöslich zu machen. So können Cyclodextrinpolymere für chromatographische Trennverfahren, zur Anreicherung und Reinigung von Substanzen und zur Katalyse chemischer Reaktionen verwendet werden¹³⁴⁾. Solche Polymere können einerseits durch Fixierung des Cyclodextrins an polymere Träger, z.B. an Dextrangele oder Agarosegele für die Affinitätschromatographie¹³⁵⁻¹³⁷⁾, und durch Substitution des CD mit leicht polymerisierbaren Monomeren und deren anschließende Polymerisation¹³⁸⁾ hergestellt werden, andererseits werden sie nach dem gleichen Grundprinzip wie viele andere Polysaccharidgele durch Vernetzung mit bifunktionellen Verbindungen wie Epichlorhydrin erhalten. Diese letztere Form unterscheidet sich von den anderen Polysaccharidgelen grundlegend durch die im Polymeren vorhandene Cyclodextrinstruktur, die

in der Lage ist, Einschlußverbindungen zu bilden^{139,140)}. Die durch die Vernetzung von Cyclodextrin in alkalischer Lösung entstehenden Polymere sind, sofern sie nicht wegen des niedrigen Vernetzungsgrades noch wasserlöslich sind¹¹⁶⁾, ähnlich wie Dextran- und Pullulangele gut in Wasser quellbar. Ihr Wasserrückhaltevermögen liegt bei 2-4 g H₂O/g Trockenmasse^{139,141)}. Die Einschlußverbindungen, die diese Gele bilden können, unterscheiden sich, wie bereits gesagt, wesentlich von den Einschlüssen in Dextrangele. Dies illustrieren die Isothermen des Einschlußprozesses einer Reihe organischer Verbindungen^{139,142)}. Als Beispiele sind in Abb.19 die Einschlußisothermen von o- und p-Nitrophenol sowie von Methylorange in Cyclodextrin- und in Dextrangel wiedergegeben.

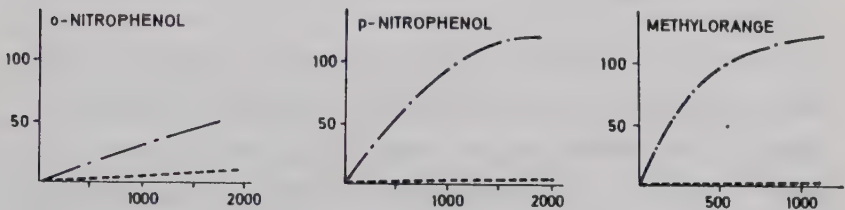


Abb.19: Isothermen des Einschlußprozesses von o- und p-Nitrophenol und Methylorange in Cyclodextrin- und Dextrangel¹³⁹⁾

Ordinate: Mol Substanz/g Harz
 Abszisse: Mol Substanz/l Lösung
 CD-Gel ---- Sephadex ----

Diese signifikante Fähigkeit des Cyclodextringels, Einschlußkomplexe verschiedener Stärke mit verschiedenen Substanzen zu bilden, wurde für ein grundsätzlich neues chromatographisches Trennverfahren ausgenutzt, die Einschlußchromatographie¹⁴⁰⁾.

Neben der Trennung der Isomeren der Chlorbenzoesäure¹⁴¹⁾ sowie der Isomeren des Nitrophenol und einiger Aminosäuren¹⁴⁰⁾ konnten in jüngster Zeit sogar die optischen Isomeren der Mandelsäure¹⁴³⁾ durch Einschlußchromatographie an polymeren Cyclodextrinen voneinander getrennt werden.

Bei der Vernetzung des α -CD in wäßriger Lösung führt jedoch die nur geringe Löslichkeit¹¹²⁾ der Ausgangsverbindung zu nicht geringen Problemen, da nur in relativ verdünnter Lösung gearbeitet werden kann. Um dies zu umgehen, sollte mit einem gut wasserlöslichen Derivat des α -CD, dem Hydroxyäthyl- α -cyclodextrin, versucht werden, ähnliche vernetzte Produkte herzustellen. Die Verwendung dieser Ausgangsverbindung sollte auch wegen des möglicherweise größeren Abstandes zwischen den Oligosaccharideinheiten zu besser quellbaren Gelen führen.

Die Vernetzung des HÄ- α -CD wurde in wäßriger Alkalilösung mit ECH durchgeführt und führte unter bestimmten Versuchsbedingungen zu Gelperlen, die im Gegensatz zu dem von Solms und Egli¹³⁹⁾ hergestellten CD-Gel keiner Zerkleinerung mehr bedurften. Diese HÄ- α -CD-Gele haben auch, wie zu erwarten war, eine größere Quellfähigkeit als CD-Gele. Es wurden Produkte mit Wasserrückhaltefähigkeiten zwischen 4 und fast 10 g H₂O/g Trockensubstanz hergestellt. Das Wasserrückhaltevermögen der vergleichbaren α -CD-Gele liegt zwischen 3,2 und 4,3 g H₂O/g Trockensubstanz; d.h. mit zunehmendem Vernetzungsgrad sinkt das Verhältnis WRV HÄ- α -CD-Gel:WRV α -CD-Gel von mehr als 2 auf nahezu 1 herab. Der Grund für dieses Verhalten

dürfte bei der höheren Reaktivität der Hydroxyäthyl-OH im Vergleich zu den Glucose-OH liegen¹²⁵⁾. Die primäre Vernetzung findet über die Hydroxyäthyl-Gruppen statt, ehe im weiteren Verlauf mehr und mehr die Vernetzung direkt am CD-Ring stattfindet. Die Möglichkeit, stärker quellbare CD-Gele herzustellen, bietet einen wesentlichen Vorteil gegenüber den schwach quellbaren CD-Gelen. Wegen der größeren Volumina der Hohlräume im Gel können auch größere Moleküle in diese eindiffundieren. Es wird dadurch also das Gebiet der Einschlußchromatographie für eine große Anzahl von Verbindungen erschlossen, deren Molekülgröße eine Anwendung dieser Methode verhinderte.

Um zu überprüfen, inwieweit das polymerisierte HÄ- α -CD noch in der Lage ist, Einschlußkomplexe zu bilden, wurde die Jodeinschlußverbindung hergestellt. Die Analyse des rostbraunen Komplexes ergab 0,45 J₂/ α -CD-Ring. Der Vergleich zu dem Einschlußverhältnis von 0,75 J₂/ α -CD-Ring in HÄ- α -CD zeigt, daß noch ca. 60 % des polymerisierten Oligosaccharids in der Lage ist, Einschlußkomplexe zu bilden.

4.3.4. Einschlußchromatographie an vernetztem Hydroxyäthyl- α -cyclodextrin

Wie bereits erwähnt, läßt sich die Eigenschaft von Cyclodextrinen, Einschlußkomplexe zu bilden, für eine neuartige Methode der Substanztrennung und -reinigung verwenden, für die

Einschlußchromatographie¹⁴¹⁾. Diese beruht darauf, daß verschiedene Moleküle verschieden starke Komplexe mit dem Cyclo-dextrin bilden. Da die Unterschiede in den Dissoziationskonstanten der Komplexe häufig nur sterische Gründe haben, können mit dieser Methode auf relativ einfache Weise Isomere voneinander getrennt werden, sofern sie in der Lage sind, Cyclo-dextrinkomplexe zu bilden. Die Trennung der beiden Isomeren o- und p-Nitrophenol ist bereits früh am CD-Gel durchgeführt worden¹⁴⁰⁾. Außerdem sind die Dissoziationskonstanten der beiden CD-Nitrophenolkomplexe bei verschiedenem pH gemessen worden^{144,145)}. Die letzteren Messungen bestätigen den aus dem Ergebnis der Chromatographie der Nitrophenole an CD-Harz gezogenen Schluß, daß p-Nitrophenol einen stabileren Einschlußkomplex mit Cyclodextrinen bildet, als das o-Isomere. Um die Tauglichkeit des hergestellten HÄ- α -CD-Gels für die Einschlußchromatographie zu testen, boten sich also diese beiden Nitrophenole an. Als weitere Testsubstanzen wurden Methylorange, das mit α -CD einen besonders stabilen Komplex bildet^{144,146)}, und Methylrot ausgewählt. Das Ergebnis dieser einschlußchromatographischen Trennung bestätigte voll die gestellten Erwartungen. Die Chromatographie am HÄ- α -CD-Gel führte zur vollständigen Auftrennung der Testsubstanzen, wie Abb.20 zeigt.

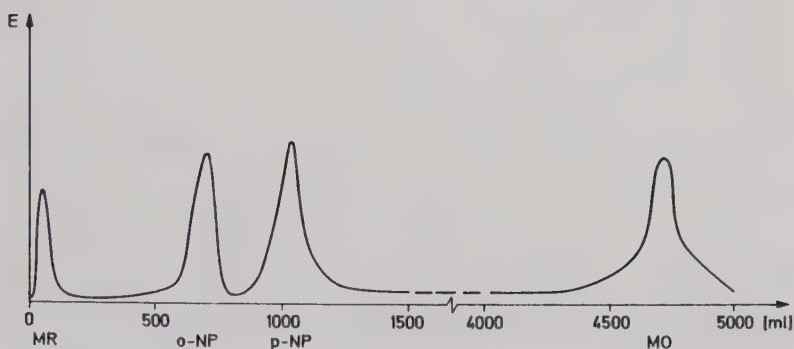


Abb.20: Trennung von o- und p-Nitrophenol, Methylorange und Methylrot an HÄ- α -CD-Gel
Säule 1cm x 30 cm, Laufgeschwindigkeit 50 ml/h

Methylrot scheint unter den gegebenen Bedingungen keinen stabilen Komplex mit dem polymeren HÄ- α -CD zu bilden, während bei den übrigen Substanzen erwartungsgemäß die Stabilität der Komplexe in der Reihenfolge o-Nitrophenol, p-Nitrophenol, Methylorange zunimmt. Das Ergebnis zeigt außerdem, daß die Säule für das gestellte Problem überdimensioniert war. Es genügt für eine solche Trennung eine weit kürzere Säule, was eine große Ersparnis gegenüber vielen anderen chromatographischen Methoden bedeutet. Um dieses zu demonstrieren, soll die Trennung von o- und p-Nitrophenylglucosid angeführt werden. Nitrophenylglucoside, -maltoside und ihre längerkettigen

Analoge sind als synthetische Substrate Testsubstanzen für eine Reihe von Enzymen^{113,147)}. Sie werden meist nach der Methode von Matsubara¹⁴⁸⁾ durch Nitrierung des Phenylglucosids, -maltosids etc., dessen Hydroxylgruppen durch Acetylfunktionen geschützt sind, hergestellt. Nach der Deacetylierung und Reinigung besteht das Produkt zu jeweils ca. 50 % aus den o- und p-Isomeren des entsprechenden Nitrophenylzuckers¹¹³⁾. Sie können mit recht großem apparativem Aufwand durch Hochdruckchromatographie getrennt werden; die Säulendimension liegt bei etwa 3000 ml Gelbettvolumen, als Säulenfüllung wird ein synthetisches Polyacrylamidgel verwendet¹⁴⁹⁾. Die Trennung von o- und p-Nitrophenylglucosid ist an einer solchen Säule von 145 cm Länge und 5 cm Innendurchmesser ($V_t = 2840$ ml) möglich, da sich die Elutionsvolumina bei jeweils ca. 300 ml substanzhaltigem Eluat um ca. 400 ml unterscheiden ($V_{E(o-NPG)} = 2800$ ml, $V_{E(p-NPG)} = 3200$ ml¹⁴⁹⁾). Zum Vergleich hierzu lassen sich die beiden Glucoside an einer HÄ- α -CD-Gel-Säule von 10 cm Länge und 1 cm Durchmesser ($V_t \approx 8$ ml) sauber trennen ($V_{e(o-NPG)} = 150$ ml, $V_{e(p-NPG)} = 200$ ml). Das bedeutet, daß bei einer solchen Trennung an HÄ- α -CD-Gel nur ein Bruchteil der Menge an Trennmittel verwendet werden muß, wie bei der Trennung durch Hochdruck-Gelchromatographie.

Schließlich ist noch zu vermerken, daß HÄ- α -CD-Gel bemerkenswert resistent ist gegen den Befall mit Mikroorganismen. Auch nach viermonatigem offenem Stehen bei pH 7-8 trat kein merklicher Abbau des Gels ein.

4.4. Hochquellbares α -Cyclodextringel

Nach den Erfahrungen mit Pffropfcopolymerisaten des Pullulan und der verflüssigten Stärke, war auch bei der Pffropfcopolymerisierung des α -CD kein für chromatographische Zwecke geeignetes Gel zu erwarten. Es sollte dennoch ein solches α -CD-Gel hergestellt werden, da dieses Gel wegen der Fähigkeit des Cyclodextrins, Einschlußkomplexe zu bilden, für eine Anwendung in pharmazeutischen Präparaten besonders vielversprechend schien. Es konnte nach dem bei Pullulan und Stärke bereits angewendeten Verfahren ein hochquellbares α -CD-Gel mit einem Wasserrückhaltevermögen von 250 g H_2O /g Trockensubstanz hergestellt werden. Auch bei diesem Gel ist die Quellbarkeit stark von der Ionenkonzentration abhängig. Diese in Abb.21 dargestellte Abhängigkeit ist im gemessenen Bereich bei einer doppelt logarithmischen Auftragung linear (Abb.22).

Die Trockensubstanz dieses Gels besteht zu etwa 30 % aus α -CD und 70 % Acrylpolymeren, das wiederum aus Polyacrylamid-polyacrylat-copolymeren im Verhältnis 1:1 besteht. Um die Aufnahmefähigkeit des polymerisierten α -CD für Gastmoleküle zu testen, wurde der Jodkomplex hergestellt. Es zeigte sich, daß das im Gel befindliche α -CD ebenso gut Jodeinschlüsse bildet wie freies α -CD, nämlich 1,2 Mol J_2 /Mol α -CD komplexiert. Das eingeschlossene Jod kann quantitativ mit Aceton ausgetrieben werden. Diese Eigenschaft, kleinere Gastmoleküle, die auch medizinisch wirksame Substanzen sein können, einzulagern und diese nach und nach wieder abzugeben, sowie die große Wasser-

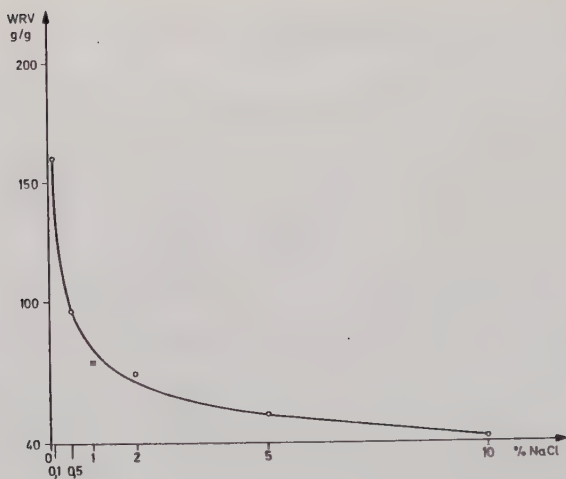


Abb.21: Abhängigkeit des Quellvermögens des Cyclodextrin-acrylamid-acrylat-Copolymerisats vom Salzgehalt des Wassers. (Auftragung linear)

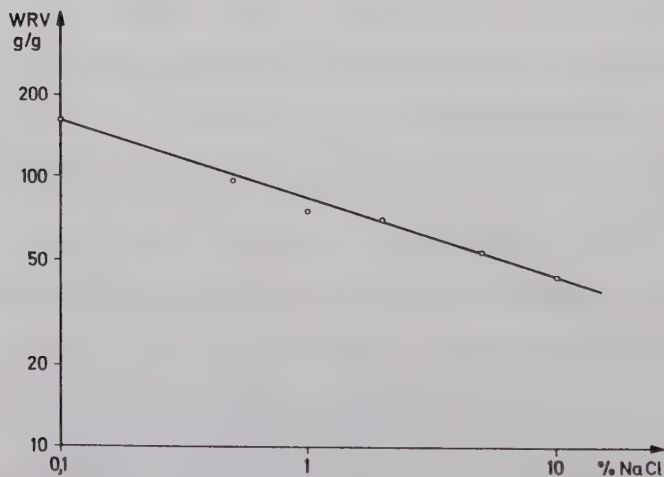


Abb.22: Abhängigkeit des Quellvermögens des Cyclodextrin-acrylamid-acrylat-Copolymerisats vom Salzgehalt des Wassers. (Auftragung logarithmisch)

aufnahmefähigkeit und die ausgezeichnete Transparenz - auch als bläulicher Jodkomplex - lassen das hochquellbare Cyclo-dextringel sehr geeignet für medizinische Zwecke, insbesondere zur Brandwundenabdeckung, erscheinen. Denn gerade die Kombination der genannten Eigenschaften ist eine Voraussetzung für diese Verwendung⁷⁸⁾.

5. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, technologisch verwertbare Derivate des Pullulan, einer durch Cyclodextrin-glucanotransferase verflüssigten Stärke sowie von α -Cyclodextrin herzustellen. Diese Kohlenhydrate boten sich wegen einiger interessanter Eigenschaften besonders an. So ist z.B. das Pullulan, wie bereits beschrieben, in der Lage, sauerstoffundurchlässige Folien zu bilden. Diese Folien sind wasserlöslich, daher war es interessant zu erfahren, ob wasserunlösliche Derivate des Pullulan auch solche Folien liefern. Außerdem ist das Pullulan, ebenso wie die enzymatisch verflüssigte Stärke, sehr gut wasserlöslich und damit für viele chemische Umsetzungen leicht zu handhaben. Das α -Cyclodextrin versprach aufgrund seiner außerordentlichen katalytischen und komplexbildnerischen Eigenschaften interessante Derivate zu liefern.

Ein wichtiger Punkt war die Darstellung von chromatographischen Trennmitteln. Speziell sollte hierbei versucht werden, gegenüber herkömmlichen polysaccharidhaltigen Trennmitteln größere Resistenz gegen Mikroorganismen, größere Bandbreite der Anwendungsmöglichkeiten sowie größere Wirtschaftlichkeit zu erreichen.

Als neue Trennmedien für die Gelchromatographie konnten durch Epichlorhydrin-Vernetzung Gele auf Pullulan- und Stärkebasis hergestellt werden. Diese sind entsprechend den verschiedenen "Sephadex"-Qualitäten zur Trennung von Molekülen verschiedener Molekulargewichtsbereiche in der Lage, wobei Pul-

lulan wegen der längerkettigen Pullulanmoleküle zu stärker quellfähigen Gelen vernetzt werden kann, die vor allem für die Trennung von Proteinen und anderer hochmolekularer Stoffe in Frage kommen, und verflüssigte Stärke wegen der kleineren Polysaccharidmoleküle zu Gelen geringerer Quellbarkeit polymerisiert, die für die Separierung kleinerer Moleküle (M in der Größenordnung um 10^3) geeignet sind.

Die Gültigkeit der bei Dextrangelen aufgestellten Beziehungen zwischen den Molekulargewichten chromatographierter Substanzen und den Elutionsvolumina konnte auch bei Pullulangelen bestätigt werden.

Die neuen Gele zeichnen sich weiterhin durch die Eigenschaft aus, daß sie Folien bilden können. An wiedergequollenen Folien aus Pullulangel wurde die Verwendbarkeit als Trennmedium für die Elektrophorese nachgewiesen. Für die Verwendung von Pullulanderivaten in der Affinitätschromatographie konnten -SH und -NH₂-Derivate des Pullulan hergestellt werden.

Durch Propfpolymerisation mit Acrylnitril und deren partielle Verseifung wurden aus Pullulan, verflüssigter Stärke und α -Cyclodextrin hochquellbare Gele hergestellt. Diese scheinen zwar für chromatographische Trennungen nicht geeignet zu sein, doch bietet sich ihre Verwendung als medizinische Gele an. Hierzu ist wohl besonders das α -Cyclodextrin-Copolymere geeignet, da es mit niedermolekularen, physiologisch aktiven Stoffen Einschlußkomplexe bilden kann. Von α -Cyclodextrin konnten zwei gut wasserlösliche Derivate hergestellt werden, nämlich

hochsubstituiertes Carboxymethyl- α -cyclodextrin und Hydroxy-
äthylcyclodextrin. Letzteres eignet sich sehr gut als Aus-
gangssubstanz für die Herstellung von Cyclodextringelen.
Durch die Verwendung von Hydroxyäthyl- α -cyclodextrin kann bei
der Vernetzung in konzentrierteren Lösungen gearbeitet und
können besser quellbare Cyclodextringele hergestellt werden.
Hydroxyäthyl- α -cyclodextringel ist ein vorzügliches Trennme-
dium für die Einschlußchromatographie, eine Methode, die auf
der Komplexbildungsfähigkeit des Cyclodextrin beruht. Es
konnte gezeigt werden, daß die Einschlußchromatographie in
gewissen Fällen große Vorteile gegenüber herkömmlichen Chro-
matographiemethoden bietet.

Die Resistenz der hergestellten Gele nimmt vom Hydroxyäthyl-
 α -cyclodextrin- über das Pullulan- zum Stärkegel ab. Während
bei ersterem bisher keinerlei Befall mit Mikroorganismen be-
obachtet werden konnte, wird Pullulangel nur bei längerem of-
fenem Stehen von Schimmelpilzen befallen. Stärkegel dagegen
scheint recht anfällig für einen solchen Befall zu sein. Die-
ser Befund wird auch dadurch gestützt, daß bei Hydroxyäthyl-
 α -cyclodextrin kein Abbau durch Cyclodextrin-glucanotransfe-
rase nachgewiesen werden konnte und bereits früher⁵²⁾ die Ab-
nahme der Spaltbarkeit des Pullulans durch Pullulanase mit der
Zunahme des Substitutionsgrades gezeigt wurde.

Ein wirtschaftlicher Vorteil der neuen Gele gegenüber den her-
kömmlichen Polysaccharidgelen läßt sich aus den niedrigen
Preisen von Stärke und Pullulan schließen. Cyclodextringele
für die Einschlußchromatographie dürften trotz der wahrschein-

lich höheren Herstellungskosten aufgrund des weitaus geringeren Materialbedarfs gegenüber der Gelpermeationschromatographie zu wesentlichen Einsparungen führen.

Abschließend kann gesagt werden, daß es im Rahmen dieser Arbeit gelungen ist, auf dem Gebiet kohlenhydrathaltiger Trennmedien einige interessante neue Produkte herzustellen und eine Reihe ihrer Eigenschaften aufzuzeigen; doch bleiben gerade in diesem Bereich noch viele offene Fragen, deren Beantwortung der Zukunft vorbehalten ist.

6. Experimenteller Teil

6.1. Pullulan

6.1.0. Reinigung des Pullulan

Bei allen Ansätzen wurde im Chemischen Laboratorium der Universität Freiburg hergestelltes Pullulan (# 7001) verwendet. Das Rohpullulan, das einen geringen Prozentsatz oligomerer Zucker und anderer Verunreinigungen enthielt, wurde in Wasser zu einer 5 %igen Lösung gelöst und 1 Stunde bei 15000 U/min zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde mit dem gleichen Volumen Methanol versetzt und das dabei entstandene Präzipitat in Wasser zu einer 10 %igen Lösung gelöst. Diese Lösung wurde lyophilisiert.

6.1.1. Mercaptoäthylisierung des Pullulan

Zu 40 ml einer 5 %igen Pullulanlösung in Wasser wurden 10 g einer 22 %igen Natronlauge gegeben. Danach wurde unter Stickstoff eine definierte Menge Äthylensulfid zugetropft und 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt fiel bei Substitutionsgraden $< 0,2$ als weißer Pudding an, der mit Wasser und Methanol gewaschen wurde. Bei Substitutionsgraden

0,2 mußte das Produkt mit Methanol präzipitiert werden.

Das Präzipitat wurde mit Methanol gewaschen. Den Zusammenhang von zugesetztem Äthylensulfid und Substitutionsgrad zeigt Tabelle I:

Tabelle I:

ml C_2H_4S	0,1 - 0,3	0,75	1,5	5,0
% S	2,4 - 2,6	3,8	5,5	20,4
DS	0,15- 0,16	0,25	0,35	1,64
Wasser- löslichkeit	+	q	q	-

+ löslich; q quellbar; - unlöslich

6.1.2. Aminoäthylisierung von Pullulan

1 g pulverisiertes Pullulan wurde in 50 ml Toluol suspendiert und 0,1 ml Benzylchlorid oder Epichlorhydrin als Katalysator und eine definierte Menge Äthylenimin zugesetzt. Diese Reaktionsmischung wurde 48 Stunden am Rückfluß gekocht, nach dem Abkühlen wurde abgenutscht und der Rückstand mit Toluol, Aceton und Wasser gewaschen. Die Produkte waren gelbliche, in Wasser quellbare Substanzen.

Den Zusammenhang von Äthyleniminzugabe, Katalysator und Substitutionsgrad zeigt Tabelle II:

Tabelle II:

ml C_2H_4NH	0,10	0,15	0,25	1,0	10,0	15,0
Katalysator	BC	BC	BC	BC	ECH	BC
% N	1,0	1,3	1,7	2,6	2,9	10,5
DS	0,12	0,16	0,21	0,33	0,37	1,82

6.1.3. Vernetzung des Pullulan

6.1.3.1. Vernetzung in Dimethylsulfoxid

4,1 g Pullulan wurden in 75 ml DMSO gelöst und eine definierte Menge $\text{Ba}(\text{OH})_2$ zugegeben. Nach zehnminütigem Rühren wurde eine bestimmte Menge Epichlorhydrin zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 60 Minuten bei $60-65^\circ\text{C}$ und weitere 90-120 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel dekantiert, der Rückstand in Wasser suspendiert, mit 1N Salzsäure neutralisiert und abgenutscht. Das Produkt, ein in Wasser quellbares Gel, wurde mehrmals mit Wasser gewaschen. Den Zusammenhang von Epichlorhydrin- und Basenzugabe und dem Wasserrückhaltevermögen des Gels zeigt Tabelle

III:

Tabelle III:

ml ECH	0,5	1,0	0,75	1,0	0,75	0,3
mg $\text{Ba}(\text{OH})_2$	22,5	25,0	20,0	20,0	7,0	12,0
WRV [g H_2O /g Trockensub- stanz]	8,7	8,9	11,3	14,2	14,3	25,6

6.1.3.2. Vernetzung in Wasser/Toluol

Zu einer Lösung von 8,1 g Pullulan in 4 ml Wasser und 12 ml 6N Natronlauge wurden 24 ml Toluol mit 0,1 g Stearinsäure zugesetzt und unter heftigem Rühren eine definierte Menge Epichlorhydrin zugetropft. Nach einstündigem Rühren bei 60°C wurde das Produkt abgenutscht und mit Toluol, Äthanol und

Wasser gewaschen. Es wurden in Wasser gut quellbare Gele mit unterschiedlichem Wasserrückhaltevermögen erhalten. Den Zusammenhang von Epichlorhydrin-Zugabe und Wasserrückhaltevermögen zeigt Tabelle IV:

Tabelle IV:

ml ECH	1,4	1,0	0,8	0,6
WRV [g H ₂ O/g Trockensubstanz]	7,9	17,9	23,5	- (löslich)

6.1.3.3. Vernetzung in Wasser

16,2 g Pullulan wurden in 8 ml Wasser und 24 ml 6N Natronlauge gelöst. Nach Zugabe von 1,6 ml Epichlorhydrin wurde 5 Minuten auf 45°C erhitzt. Der entstandene Gelkloß wurde mit dem Spatel zerkleinert und mit viel Wasser gewaschen. Danach wurde das Gel im Waringblender fein zermahlen, mit Methanol präzipitiert und das Präzipitat mit viel Wasser neutral gewaschen. Das Produkt war ein in Wasser gut quellbares Gel mit einem Wasserrückhaltevermögen von 26,3 g H₂O/g Trockensubstanz.

6.1.4. Pfropfpolymerisierung mit Acrylnitril

21,5 g Pullulan wurden in 273 ml dest. Wasser gelöst und bei 30°C 20 g Acrylnitril und eine Lösung von 0,63 g Ammoniumcer(IV)-nitrat in 11 g 0,1N HNO₃ zugesetzt. Nach zweieinhalb-stündigem Rühren wurde durch Zugabe von 5 ml 1N KOH der pH auf 7,5 gebracht und 2 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Nach langsamer Abkühlung des Reaktionsgemisches über Nacht wurde dieses mit 17,3 g KOH versetzt und 1 Stunde bei 95° verseift. Der entstandene Gelklumpen wurde in Methanol mit Essigsäure neutralisiert und anschließend durch mehrmaliges Quellen in dest. Wasser und Ausfällen in Aceton gereinigt. Das Produkt hat eine Wasserrückhaltevermögen von 370 g H₂O/g Trockensubstanz.

6.2. Verflüssigte Stärke

6.2.1. Vernetzung mit Epichlorhydrin

6,4 g fl. Stärke wurde mit 6,4 ml Wasser benetzt und dann in 20 ml 6N NaOH gelöst, eine definierte Menge Epichlorhydrin zugesetzt und 20 Minuten bei 40°C gerührt. Der entstandene Gelklumpen wurde abgenutscht und mit viel Wasser gewaschen. Nach Zerkleinerung im Waringblender wurde nochmals auf der Nutsche mit viel Wasser gewaschen, bis das Waschwasser neutral blieb. Den Zusammenhang von Epichlorhydrinzugabe und Wasserrückhaltevermögen des Produktes zeigt Tabelle V:

Tabelle V:

ml ECH	0,35	1,5	3,2	6,4	16
WRV g H ₂ O/g	-+)	-++)	5,21	3,9	2,7
Trockensubstanz					
+) löslich;	++) schleimiges Produkt				

6.2.2. Pfropfpolymerisierung mit Acrylnitril

21,5 g fl. Stärke wurde in 273 ml dest.H₂O gelöst und bei 30°C 20 g Acrylnitril und 6,3 Ammoniumcer(IV)-nitrat in 11 g 0,1N HNO₃ zugesetzt. Nach zweieinhalbstündigem Rühren wurde mit 5 ml 1N KOH der pH auf 7,5 gebracht und dann das Acrylnitril/H₂O-Azeotrop während 2 Stunden langsam abdestilliert. Nach Auskühlen des Reaktionsgemisches über Nacht wurden 17,24 g KOH zugegeben und 1 Stunde bei 95°C verseift. Der entstandene Gelklumpen wurde in Methanol mit Essigsäure neutralisiert, mit Methanol und Aceton entwässert und gewaschen und schließlich in Aceton mit dem Ultraturrax pulverisiert, abgenutscht und bei RT getrocknet. Das entstandene Pulver quillt in Wasser und vermag 330 g dest.H₂O/g Substanz zurückzuhalten.

6.3. α -Cyclodextrin (Cyclohexaamylose)

6.3.0. Reinigung

Roh- α -Cyclodextrin enthält neben β - und γ -Cyclodextrin (Cyclohepta- und octaamylose) noch Glucose und Oligosaccharide als Verunreinigung. Um diese zu entfernen wurde das Roh- α -CD in kochendem Wasser zu einer gesättigten Lösung gelöst und heiß filtriert. Nach dem Abkühlen wurde mit dem gleichen Volumen Methanol versetzt und wenige ml Cyclohexan zugegeben. Beim Stehen bei $\approx 4^{\circ}\text{C}$ fällt das α -CD als weiße, kristalline, dünnschichtchromatographisch einheitliche Substanz aus.

6.3.1. Carboxymethylierung von α -CD

9,3 g NaH wurden in 170 ml DMSO abs. gegeben und 5 Stunden bei 60°C gerührt. Die Konzentration des Methylsulfinylmethylcarbanions wurde durch Titration mit 0,1N Salzsäure bestimmt. Die Lösung ist unter den angegebenen Bedingungen ca. 1M.

Zu einer definierten Lösung von α -CD in abs. DMSO wurde eine bestimmte Menge der oben beschriebenen MSM-Lösung gegeben. Das entstandene grünliche Gel wurde bis zur vollständigen Verflüssigung gerührt. Nach Zugabe von Natriumchloracetat wurde ca. 18 Stunden bei RT und anschließend 2 Stunden bei 30°C gerührt.

Danach wurde das Reaktionsgemisch, sofern nicht nachcarboxymethyliert wurde, auf Eis gegossen, die Mischung mit dem

doppelten Volumen Methanol versetzt und das Präzipitat abgenußt und wieder in H_2O gelöst. Diese Lösung wurde über eine Säule mit Amberlite IR 120 gereinigt und danach einrotiert.

Teilweise wurde der Rk-Ansatz vor dem Aufarbeiten nachcarboxymethyliert, indem nochmals Natriumchloracetat zugesetzt und 7 Stunden bei $30^{\circ}C$ und 19 Stunden bei RT weitergerührt wurde. Danach wurde ebenfalls wie oben beschrieben aufgearbeitet.

Die erzielten Substitutionsgrade zeigt Tabelle VI:

Tabelle VI:

g α -CD	ml DMSO	+ml MSM-Lösg.	+g NaClAc	+g NaClAc	DS
4,5	165	80	10	-	1,4
4,0	200	80	6,5	-	1,0
4	200	80	6,5	20	1,6

6.3.2. Hydroxyäthylierung von α -CD

4,5 g α -CD wurde in 80 ml H_2O , das 5 g NaOH enthält, gelöst und 3,5 g Äthylenoxid während 5 Stunden bei $40^{\circ}C$ in die Lösung eingeleitet. Nach Beendigung der Gaseinleitung wurde über Nacht bei $40^{\circ}C$ weitergerührt. Die Lösung wurde dann mit Amberlite IR 120 neutralisiert, und in Aceton gegossen. Das Präzipitat wurde mit Aceton und Äther gewaschen und im Wasser-

strahlvakuum getrocknet. Das so erhaltene Rohprodukt wurde zu einer ca. 30 %igen Lösung in Wasser gelöst und nach Abzentrifugieren der Trübung mit wenig Cyclohexan versetzt, sodaß das unumgesetzte α -CD ausfiel. Nach dem Abzentrifugieren wurde das Zentrifugat einrotiert. Das Produkt enthält eine Hydroxyäthylgruppe/CD-Ring.

Analyse: $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ber.: 4,33 % gef.: 4,0 %

6.3.3. Methylierung von Hydroxyäthyl- α -CD

Zu 1 g HÄ- α -CD in 5 ml DMSO wurden 15 ml Methyljodid und 10 g BaO gegeben und die Suspension 16 Stunden bei 40°C gehalten. Nach einer weiteren Zugabe der gleichen Menge Methyljodid und BaO wurde die Suspension weitere 4 Tage bei 40°C gehalten. Das überschüssige Methyljodid wurde abrotiert und der Rückstand 5 mal mit 40 ml CHCl_3 extrahiert, die vereinigten Extrakte im Vakuum bei 50°C eingeengt und das Produkt an Aktivkohle adsorbiert und danach mit Benzol ausgewaschen. Das Produkt wurde aus CHCl_3 /Petroläther umkristallisiert.

OCH_3 -Gehalt gef.: 24,8 % ber. f.DS = 2 : 31,4 %

Das Produkt wurde danach nochmals auf die gleiche Weise nachmethyliert.

OCH_3 -Gehalt gef.: 36,1 % ber. f.DS = 3 : 35,9 %

6.3.4. Vernetzung von Hydroxyäthyl- α -CD

3,2 g HÄ- α -CD wurden in 3,2 ml H_2O und 10 ml 6N NaOH gelöst, 3 g NaOH und 0,5 g $NaBH_4$ zugesetzt und eine definierte Menge Epichlorhydrin zugegeben. Nach einstündigem starken Rühren bei 40°C wurde das Produkt abgenutscht und, falls es wegen zu schwachem Rühren nicht bereits in Form von Gelkörnern anfiel, zerkleinert und mit viel Wasser neutral gewaschen. Das Gel wurde dann bei Raumtemperatur im Vakuum über $CaCl_2$ getrocknet.

Die erhaltenen Produkte unterscheiden sich je nach Vernetzungsgrad im Wasserrückhaltevermögen.

Tabelle VII:

g ECH	15	10	9,5	8
WRV g H_2O / g Tr.Subst.	3,96	6,48	7,12	9,35

6.3.5. Vernetzung von α -CD

1,6 g α -CD in 9 ml Wasser wurden mit 3 g NaOH und 0,2 g $NaBH_4$ versetzt, eine bestimmte Menge Epichlorhydrin zugesetzt und 1 Stunde bei 40°C gerührt.

Der entstandene Gelklumpen wurde zerkleinert und mit viel Wasser gewaschen. Die Produkte waren quellbare Gele, deren Wasserrückhaltevermögen vom Vernetzungsgrad abhängt. Den Zusammenhang zeigt Tabelle VIII.

Tabelle VIII:

ml ECH	7,5	5	4
WRV g H ₂ O/ g Tr.Subst.	3,2	3,7	4,3

6.3.6. Pfropfpolymerisation mit Acrylnitril

21,5 g α -CD wurden bei Siedehitze in 273 ml Wasser gelöst. Nach Abkühlung auf 30°C wurden 20 g Acrylnitril und 0,63 g $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ in 11 g 0,1N HNO_3 zugesetzt und 3 Stunden gerührt. Anschließend wurde nach Zugabe von 5 ml 1N KOH 2 Stunden bei 95°C gerührt und dann langsam auskühlen gelassen. Schließlich wurden 17,3 g KOH zugegeben und 1 Stunde bei 95°C verseift. Der entstehende Gelklumpen wurde in Methanol gegeben und mit Essigsäure neutralisiert, dann wurde das Präzipitat in Aceton zerkleinert und mit Aceton gewaschen. Das Produkt quillt in dest. H_2O zu einem Gel mit einem WRV von 250 g $\text{H}_2\text{O}/\text{g}$ trockene Substanz.

6.3.7. Jodeinschlußkomplexe mit α -CD und seinen Derivaten

Zu einer möglichst konzentrierten Lösung (bzw. Suspension im Falle eines Gels) von α -CD bzw. seines Derivates wird das gleiche Volumen einer gesättigten wäßrigen Jodlösung (mit

0,5 % KJ) gegeben und nach kräftigem (bei Suspensionen in ca. zweistündigem Abstand zweimal wiederholtem) Umschütteln 24 Stunden stehengelassen. Der entstandene kristalline Niederschlag (bzw. das Gel) wurde abfiltriert, nacheinander mit 0,5 %iger KJ-Lösung und destilliertem Wasser gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur über CaCl_2 im Exsikkator getrocknet.

6.4. Analytische Methoden

6.4.1. Bestimmung der Carboxymethylgruppen

Die Bestimmung des Substitutionsgrades der carboxymethylierten Cyclodextrine wurde in Anlehnung an die Methode von Eyler und Klug¹⁵⁰⁾ durchgeführt. Das Natriumsalz wurde über eine Ionenaustauschersäule mit Amberlite IR 120 in die freie Säure überführt. Das Produkt wurde nach mehrmaligem Waschen mit Methanol im Trockenschrank bei 80°C getrocknet. Eine Probe von 2 g wurde nochmals 1 Stunde bei 100°C getrocknet, in einem Erlenmeyer-Kolben eingewogen und 20 ml H_2O und exakt 50 ml 0,5N Natronlauge zugegeben. Die Mischung wurde geschüttelt, bis sich die Probe gelöst hatte. Dann wurde die Lösung mit 0,5N Salzsäure bis zum Phenolphthalein-Endpunkt zurücktitriert. Der Substitutionsgrad berechnet sich nach der Formel:

$$\text{DS}_{\text{CM}} = \frac{0,162 \cdot A}{1 - 0,058 \cdot A}$$

A = Milliäquivalent NaOH/g Probe

6.4.2. Wasseraufnahmefähigkeitsmessungen

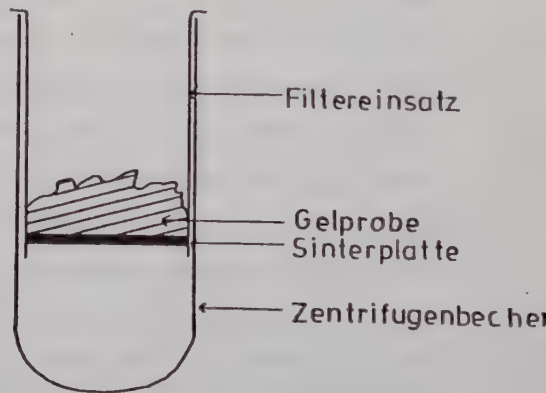
6.4.2.1. WRV von ECH-vernetzten Gelen

Das Wasserrückhaltevermögen von ECH-vernetztem Pullulan, flüssiger Stärke und α -CD bzw. HÄ- α -CD wurde nach der Methode von Pepper et al.¹⁵¹⁾ gemessen. Dabei wurde das gequollene Gel in einem Zentrifugenbecher, der einen Einsatz mit Sinterplatte besitzt (s. Abb. 23), jeweils 30 min mit 1500 U/min zentrifugiert. Danach wurde das Gel gewogen und bei 60°C im Vakuum über P_2O_5 getrocknet. Das trockene Gel wurde nochmals gewogen. Das Wasserrückhaltevermögen ist das Verhältnis von aufgenommener Wassermenge zur Trockensubstanz:

$$WRV = g \text{ H}_2\text{O} / g \text{ trockenes Gel}$$

Abbildung 23:

Zentrifugeneinsatz zur
Wasseraufnahmebestimmung



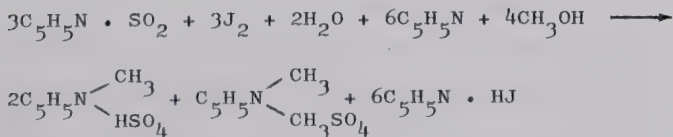
6.4.2.2. Wasseraufnahme von AN-Pfropfpolymeren

Die oben beschriebene Methode der WRV-Bestimmung eignet sich für AN-Pfropfpolymere nicht, da diese Gele nicht so druckbeständig sind und Sinterplatten, Filter etc. leicht verstopfen.

Es wurde daher zunächst die Trockensubstanz gewogen und dann eine überschüssige Menge dest. H_2O , bzw. NaCl-Lösung, zugegeben. Nach vollständigem Quellen der Probe wurde das unverbrauchte Wasser dekantiert und das gequollene Gel gewogen. Das Wasseraufnahmevermögen berechnet sich ebenso wie bei den ECH-vernetzten Gelen.

6.4.3. Bestimmung von Kristallwasser nach Karl Fischer

Zur genauen Bestimmung des Substitutionsgrades was es oft nötig, zuvor den Wassergehalt eines Produktes zu bestimmen. Dies wurde nach der Karl-Fischer-Methode^{152,153)} durchgeführt. Freies oder als Kristallwasser gebundenes Wasser kann direkt titrimetrisch bestimmt werden. Das Verfahren beruht darauf, daß durch Pyridin stabilisiertes SO_2 mit Jod in Gegenwart von Methanol mit Wasser nach folgender wahrscheinlichen Bruttogleichung reagiert:



Die verwendete Maßlösung entsteht durch eine Mischung im Verhältnis 1:1 der beiden folgenden Lösungen:

1. 84 g Jod in 530 g wasserfreiem Methanol

2. 64 g SO_2 in 265 g wasserfreiem Pyridin

Der Titer der Maßlösung wurde 12 Stunden nach dem Mischen bestimmt und mehrmals überprüft. Als Lösungsmittel wurde wasserfreies Methanol verwendet. Der Endpunkt der Titration wurde nach der Dead-stop-Methode erkannt. Hierbei wird an zwei gleiche, in die Lösung tauchende Platinelektroden eine geringe Spannung gelegt. Ein Strom kann nur fließen, wenn sowohl eine an der Anode oxydierbare als auch eine an der Kathode reduzierbare Substanz vorhanden ist. Es erfolgt eine Elektrolyse bei der geringen angelegten Spannung (100 mV). In der skizzierten Meßanordnung (s. Abb. 24a) kann die Veränderung der Stromstärke oder der Spannung in Abhängigkeit vom zugesetzten Maßlösungsvolumen gemessen werden. Im Falle der Karl-Fischer-Titration ergeben sich dabei die beiden folgenden Kurventypen, wobei der Endpunkt der Titration (Vorhandensein des Redoxsystems $\text{J}_2/\text{J}^\cdot$) jeweils durch einen Kurvensprung zu erkennen ist.

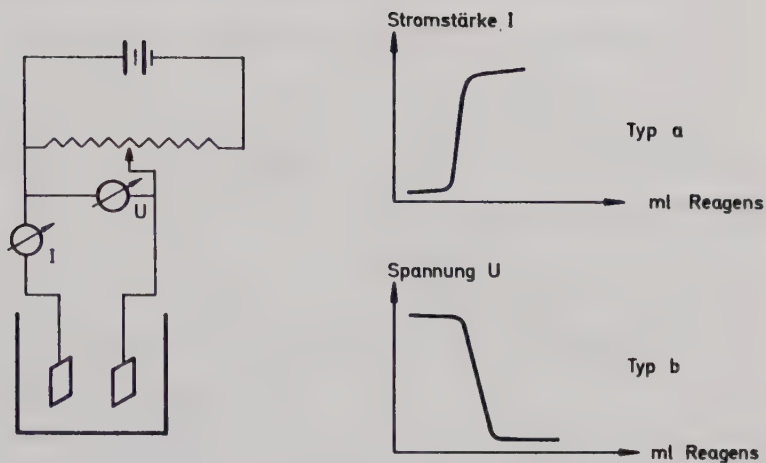


Abb.24:

a. Schematische Meßanordnung
für die Karl-Fischer
Titration

b. Spannung- bzw. Stromstärken-
änderung beim Endpunkt der
Titration

6.4.4. Glucose-Bestimmung mit Anthron

Zur indirekten Bestimmung des Substitutionsgrades mußte bei einigen Produkten der Glucosegehalt bestimmt werden. Dies wurde mittels des Anthron-Tests¹⁵⁴⁾ gemacht. Die Methode beruht auf der Bildung eines stark gefärbten Anthron-Glucose-Komplexes in 2/3-konzentrierter Schwefelsäure. Als Reagens

wurde eine frisch hergestellte Lösung von 180 mg Anthron in 100 ml konz. H_2SO_4 verwendet. Es wurden jeweils 4 ml des Reagens mit 2 ml wäßriger Lösung der Polyglucose vermischt und nach je 15 min Aufbewahrung bei Raumtemperatur und danach bei $0^\circ C$ die Extinktion bei 578 nm am Spektralphotometer Zeiss PM4 bei $20^\circ C$ gemessen. Die Auswertung der Extinktionsmessung erfolgte durch den Vergleich mit einer Eichkurve (s. Abb. 25), die mittels einer Verdünnungsreihe einer definierten Glucose-lösung aufgenommen worden war.

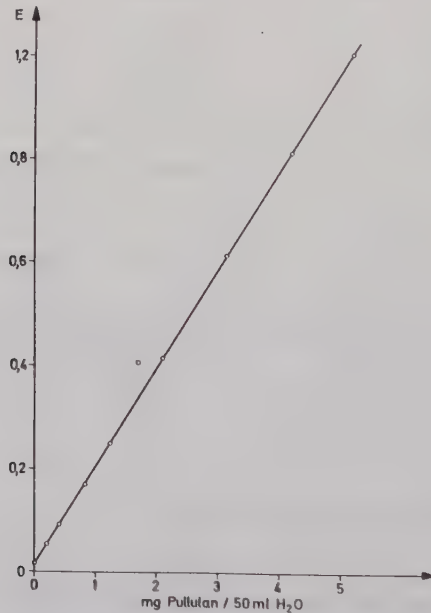


Abb. 25: Eichkurve des Anthron-Tests zur Glucosebestimmung

6.4.5. Methoxyl- und Hydroxyäthyl-Bestimmung

Eine der bekanntesten analytischen Standardmethoden der organischen Chemie ist die Methoxybestimmung nach Zeisel¹⁵⁵⁾, die auch zur Bestimmung weiterer Alkoxygruppen benutzt wird. Sie basiert auf der Ätherverseifung mit Jodwasserstoff und der anschließenden Titration des entstandenen Alkyljodids nach verschiedenen Methoden.

Die Bestimmung der Methoxyl- und Hydroxyäthylgruppen für diese Arbeit erfolgte nach o.g. Methode im Mikroanalysenlabor der Firma Sandoz AG in Basel. Der Substitutionsgrad berechnet sich aus den Analysenwerten nach folgenden Formeln:

Hydroxyäthyl/Glucose

$$DS = \frac{\% \text{ HÄ-Gruppen}}{100-\% \text{ HÄ-Gruppen}} \times \frac{162}{44}$$

Hydroxyäthyl/Cyclodextrin

$$DS = \frac{\% \text{ HÄ-Gruppen}}{100-\% \text{ HÄ-Gruppen}} \times \frac{162 \times 6}{44}$$

Methoxyl/Glucose

$$DS = \frac{\% \text{ Methoxylgruppen}}{214,3-\% \text{ Methoxylgruppen}} \times \frac{162}{14}$$

Methoxyl/Cyclodextrin

$$DS = \frac{\% \text{ Methoxylgruppen}}{214,3-\% \text{ Methoxylgruppen}} \times \frac{162 \times 6}{14}$$

Methoxyl/HÄ-Cyclodextrin

$$DS = \frac{\% \text{ Methoxylgruppen}}{214,3 - \% \text{ Methoxylgruppen}} \times \frac{162,6 + DS_{\text{HÄ/CD}} \cdot 44}{14}$$

6.5. Flotieren von Gelen

Gele von sehr unterschiedlicher Korngröße wurden durch Flotieren in verschiedene Fraktionen zerlegt. Hierzu wurde die von Turba⁶⁰⁾ für das Flotieren eines Ionenaustauscherharzes entwickelte Apparatur für den Betrieb mit Leitungswasser modifiziert und optimiert (s. Abb. 26).

Die Durchflußgeschwindigkeit wurde durch den Druck des zufließenden Wassers reguliert und mit einem Durchflußgeschwindigkeitsmesser Rota L 63 gemessen. Beginnend mit kleinen Durchflußgeschwindigkeiten (< 100 ml/min) wurden die einzelnen Fraktionen bei jeweils konstanter Geschwindigkeit abgenommen, bis klares Wasser aus der Apparatur austrat. Die Durchflußgeschwindigkeit wurde Schritt für Schritt bis ca. 800 ml/min gesteigert und der danach noch verbleibende grobkörnige Rückstand verworfen. Die einzelnen Fraktionen wurden jeweils abgenutscht und als Gelsuspension aufbewahrt.

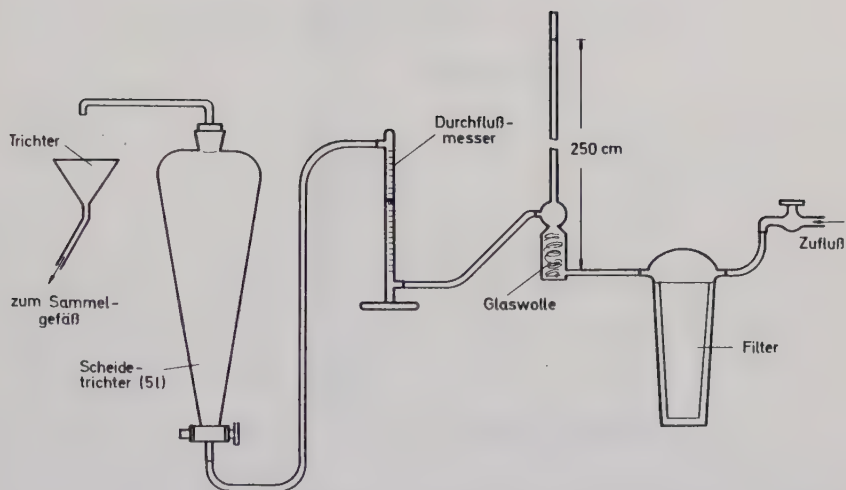


Abb.26: Flotierapparatur zur Separation von Gelpartikeln

6.6. Füllung und Betrieb von Säulen zur Gelchromatographie

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Säulen für die Gelchromatographie verwendet. Es waren dies Säulen mit einem Innendurchmesser von 1 cm und 10, 30 und 100 cm Länge. Die Versuchsanordnung wird in Abb.27 dargestellt.

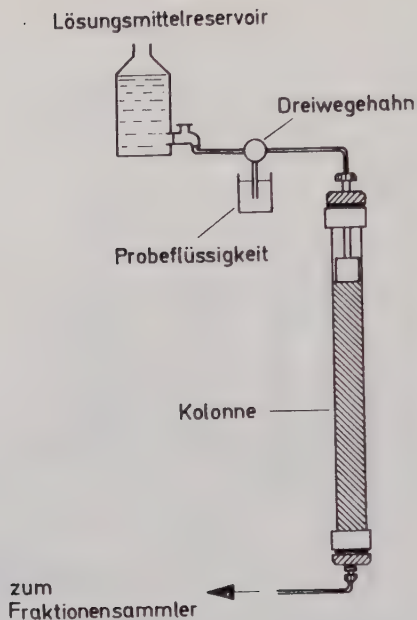


Abb.27: Versuchsaufbau für die Gelchromatographie

Zum Füllen der Säule wurde vom Kopfe der Adaptor abgenommen und stattdessen ein Trichter aufgesetzt. Die Säule wurde zu etwa $1/10$ mit Laufmittel und dann Säule und Trichter mit einer Gelsuspension gefüllt. Unter langsamen Durchfluß von Laufmittel, das von Zeit zu Zeit in den Trichter nachgegossen wurde, setzte sich die Gelsuspension ab. Nach dem Füllen der Säule wurde vor dem ersten Auftrag einer Probelösung noch das vier- bis fünffache Volumen des Gelbettes an Laufmittel durch die Säule laufen gelassen. Beim Betrieb der Säule wurde das auslaufende Lösungsmittel in einem automatischen Fraktionensammler in Fraktionen jeweils des gleichen Volumens aufge-

fangen und die relative Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen durch Messung der Extinktion bei 280 nm, 405 nm oder 436 nm an einem Spektralphotometer Zeiss PM 4 bestimmt.

Tabelle IX: Vergleich von Säulen mit Gel aus vernetztem Pullulan mit Wasserrückhaltevermögen = 23,5 g H₂O/trockenes Gel:

Säule Ø x Höhe [ml]	Gel	Lauf- geschwin- digkeit [ml/h]	V ₀ [ml]	V _e /V ₀ Hämo- globin	K _d Hämo- globin
a. 1 x 10	fein	5,4	3,7	1,30	0,3
b. 1 x 10	grob	7,0	4,5	1,38	0,5
c. 1 x 30	fein	5,0	10,3	1,45	0,38
d. 1 x 30	fein	5,0	10,3	1,40	0,37

Bei diesem Gel wurde V₀ durch die Elutionsvolumina von Dextranblau und β-Galaktosidase bestimmt, die für die jeweils gleiche Säule identisch waren. Der relativ große Unterschied im V₀ zwischen feinerem und grobkörnigerem Gel erklärt sich durch die größeren Zwischenräume bei einer Packung von größeren Partikeln. Es zeigte sich, daß das Verhältnis V_e/V₀ unabhängig ist von der Säulengeometrie und der Gelpartikelgröße, während K_d etwas von der Teilchengröße der Gelpartikel abhängt. Bei diesem Gel lassen sich Proteine, deren Größe oberhalb der Ausschlußgrenze des Gels liegt, vollständig von Proteinen mit einem Molekulargewicht von < 70000 trennen, wie die Abbildung 28 zeigt.

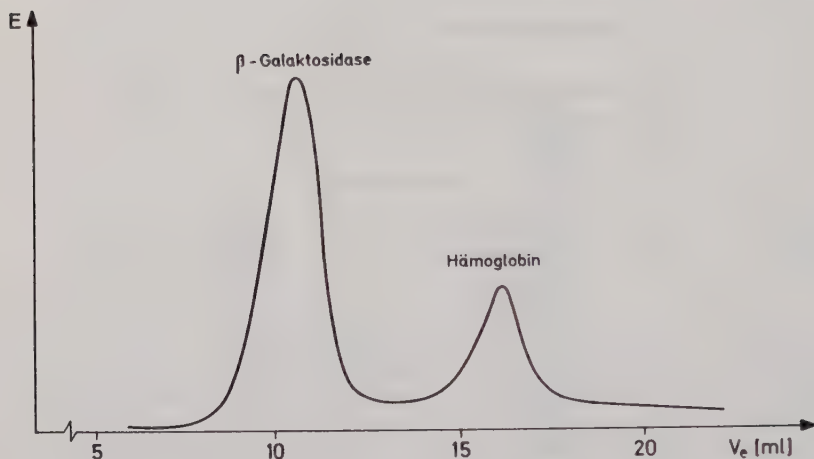


Abb.28: Trennung von β -Galaktosidase und Hämoglobin
an Pullulangel (WRV = 14,1)

6.7. Einschlußchromatographie

Für die Einschlußchromatographie an Cyclodextringelen wurde dieselbe Apparatur verwendet, wie zur Gelchromatographie. Auch das Füllen der Säule (1 x 30 cm) wurde auf die nämliche Weise durchgeführt. Als Laufmittel wurde für die Nitrophenylglucoxide dest. H₂O, für die übrigen Substanzen 0,1N Tris-

Tabelle X: Vergleich von Säulen mit Pullulangel (WRV = 14,1)

Säule $\phi \times \text{Höhe}$ [cm]	LG [ml/h]	V_o [ml]	V_e/V_o				K_d			
			I	II	III	IV	I	II	III	IV
1 x 100	7	23,4	1,22	-	-	-	0,10	-	-	-
1 x 100	4	24,0	1,35	-	-	1,88	0,16	-	-	0,42
1 x 30	10	7,4	1,12	-	1,76	-	0,11	-	0,38	-
1 x 30	11	9,1	-	-	1,57	-	-	-	0,39	-
1 x 30	9	7,2	-	1,67	-	-	-	0,32	-	-

LG = Laufgeschwindigkeit

I = Hämoglobin (M = 68000)

II = Chymotrypsinogen A (M = 25000)

III = Myoglobin (M = 17800)

IV = Cytochrom C (M = 13000)

V_o wurde jeweils durch das Elutionsvolumen von Dextranblau bestimmt.
Das Trennvermögen zeigt Abbildung 8.

(hydroxymethyl)aminomethan/HCl-Puffer (pH 9) verwendet. Die Fraktionen wurden ebenfalls durch Extinktionsmessung am Spektralphotometer Zeiss PM 4 bei 200 nm untersucht. Die chromatographierten Substanzen wurden durch Aufnahme ihres UV-Spektrums zwischen 500 nm und 100 nm identifiziert.

6.8. Folienherstellung

Zur Herstellung von Folien aus vernetztem Pullulan wurde ein Gerät, wie es auch zum Bestreichen von Dünnschichtplatten gebraucht wird, verwendet. Abbildung 29 zeigt eine schematische Darstellung dieses Gerätes.



Abb.29: Streichgerät für Folien

Die Streichhöhe S ist in 0,5 mm-Intervallen zwischen 1 mm und 3 mm wählbar. Als günstigste Streichhöhe für die feineren Pullulangele erwies sich 1,5 mm. Als Unterlage für die Folienherstellung wurde eine glatte Fläche aus Polyäthylen-, Poly-

vinylchlorid- oder Aluminiumfolie oder ein verchromtes Blech verwendet. Die geeignetste Unterlage war eine glatt aufgespannte Polyäthylenfolie. Zur Herstellung der Folie wurde das Streichgerät am Rand der Unterlage aufgesetzt und der Vorratsraum V mit einer Gelsuspension gefüllt. Darauf wurde das Gerät langsam über die Fläche geführt. Die Gelschicht trocknete bei Raumtemperatur in etwa 30 Stunden zu einer Folie ein, die sich leicht von der Polyäthylenunterlage lösen läßt.

6.9. Elektrophorese

Die elektrophoretischen Trennungen an Pullulangelen wurden in einer Desaga DE-Kammer durchgeführt. Als Trägermaterial wurde Folie aus vernetztem Pullulan verwendet. Diese wurde zu einem Rechteck im Format 80 x 180 mm geschnitten und auf eine Glasplatte im Format 100 x 200 mm mit einem 10 mm breiten und 2 mm hohen Rand gelegt. Dann wurde das Gel durch Benetzen mit einer Pufferlösung ca. 12 Stunden gequollen. Der Auftrag der Proteinlösungen erfolgte durch das Auflegen eines lösungsgetränkten Filterpapierstreifens auf eine Startlinie in der Plattenmitte. Nach Einlegen der Platte in die Elektrophoresekammer wurden die Elektrodenbehälter mit Pufferlösung gefüllt. Der Kontakt zwischen Schicht und Pufferlösung wurde durch puffergetränkte Filterpapierstreifen hergestellt. Die

Elektrophoresen wurden unter Kühlung mit 250-300 V durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel bei Raumtemperatur luftgetrocknet und als Folie aufbewahrt.

6.10. Enzymatischer Abbau von α -Cyclodextrin und Hydroxy- äthyl- α -Cyclodextrin

Eine Cyclodextrin-glucanotransferase aus *Klebsiella pneumoniae* (CGT)⁹¹⁾ ist in der Lage, Cyclohexaamylose (α -CD) unter Ringaufspaltung an einen Acceptor (Maltotriose) zu koppeln. Ob diese Ringaufspaltungsreaktion auch bei HÄ- α -CD und vernetztem α -CD noch möglich ist, wurde durch eine Modifikation des CGT-Aktivitätstests von Bender⁹¹⁾ untersucht. Folgender Spaltansatz wurde verwendet:

0,03M Citratpuffer, pH 6,2, 5mM an CaCl_2	1,7 ml
α -CD (bzw. HÄ- α -CD oder vernetztes α -CD)	
80mM (in dest. Wasser)	0,1 ml
Maltotriose, 10mM (in dest. Wasser)	0,1 ml
CGT (0,5 E/ml)(in 0,03M Citratpuffer, pH 6,2)	<u>0,1 ml</u>
	2,0 ml

Nach Durchmischung und Entnahme von 0,5 ml t_0 -Probe (Inaktivierung durch Erhitzen auf 80°C) wurde die Reaktionsmischung bei 30°C inkubiert. Nach 0,5, 1 und 4,5 Stunden wurden je 0,5 ml-Proben entnommen und durch Erhitzen die CGT inaktiviert. Es wurde von jeder Probe ca. 10 μ l auf eine HPTLC-Platte auf-

getragen und in Propanol-2/Äthanol/Wasser (28:56:16) chromatographiert. Anschließend wurde die mit einem Föhn getrocknete Platte durch Besprühen mit 50 %iger Schwefelsäure und dreißigminütiges Erhitzen auf 120°C entwickelt. Abbildung 30 zeigt die entwickelte DC-Platte.

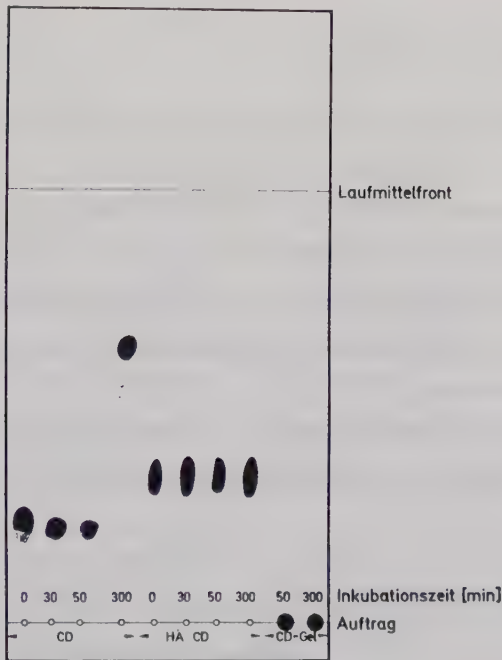


Abb.30: Dünnschichtchromatogramm des enzymatischen Abbaus von α -CD, HÄ- α -CD und α -CD-Gel

Um einen eventuellen langsamen Abbau von Hydroxyäthylcyclodextrin oder vernetztem Cyclodextrin nachzuweisen, wurden weitere Spaltansätze mit höherer Enzymkonzentration und über

längere Zeiträume inkubiert. Es konnte jedoch kein merklicher Abbau der substituierten Cyclodextrine festgestellt werden.

6.11. Verwendete Substanzen

Die eingesetzten Polysaccharide Pullulan, α -Cyclodextrin und enzymatisch verflüssigte Stärke sowie das Enzym Cyclodextrin-glucanotransferase wurden aus der mikrobiologischen Abteilung des Lehrstuhls Biochemie am Chemischen Laboratorium der Universität Freiburg bezogen. Für die Dünnschichtchromatographie von Oligosacchariden wurden HPTLC-Fertigplatten Merck 5642 verwendet.

Alle eingesetzten Chemikalien waren handelsübliche, nötigenfalls p.a. Produkte der Firmen Merck, Riedel-de Haen oder EGA-Chemie.

7. Literaturverzeichnis

1. R.L.M.Synge, A.Tiselius: Biochem.J. 46,xli(1950)
2. B.Lindqvist, T.Storgards: Nature 175,511(1955)
3. G.H.Lathe, C.R.J.Ruthven: Biochem.J. 60,xxxiv(1955)
4. G.H.Lathe, C.R.J.Ruthven: Biochem.J. 62,665(1956)
5. A.Polson: Biochim.Biophys.Acta 19,531(1956)
6. A.Polson: Biochim.Biophys.Acta 50,565(1961)
7. H.Deuel, H.Neukom: Adv.in Chemistry Series 11,51(1954)
8. J.Porath, P.Flodin: Nature 183,1657(1959)
9. J.Porath: Clin.chim.Acta 4,776(1959)
10. W.Björk, J.Porath: Acta chem.scand. 13,1256(1959)
11. E.B.Lindner, A.Elmqvist, J.Porath: Nature 184,1565(1959)
12. J.Porath: Biochim.Biophys.Acta 39,193(1960)
13. P.Flodin: Dissertation, Uppsala 1962
14. J.Porath, J.-C.Janson, T.Laas: J.Chromatogr. 60,167(1971)
15. Pharmacia Fine Chemicals: Sephadex-Ionenaustauscher,
Uppsala 1973
16. E.D.Wachsmuth, G.Pfleiderer: Biochem.Z. 336,545(1963)
17. A.M.Dozy, T.H.J.Huisman: J.Chromatogr. 40,62(1969)
18. R.Hähnel: Anal.Biochem. 10,184(1965)
19. W.D.Peckham: J.Biol.Chem. 242,190(1967)
20. S.Nishimura, F.Harada, U.Narushima, T.Seno: Biochim.
Biophys.Acta 142,133(1967)
21. T.Seno, M.Kobayashi, S.Nishimura: Biochim.Biophys.Acta
169,80(1968)
22. J.C.Caldwell: J.Chromatogr. 44,331(1969)
23. S.A.Barker, M.H.B.Hayes, R.G.Simmons: Carbohydr.Res. 5,13
(1967)

24. E.A.Peterson, H.A.Sober: J.Am.Chem.Soc. 76,1711(1954);
J.Am.Chem.Soc. 78,751(1956)
25. H.Determann, N.Meyer, T.Wieland: Nature 223,499(1969)
26. K.James, D.R.Stanworth: J.Chromatogr. 15,324(1964)
27. E.A.Peterson: Work, Work ed., Laboratory Techniques in
Biochemistry and Molecular Biology Vol.2, Part II,
North Holland Publ.Comp., Amsterdam, London 1970
28. P.Cuatrecasas, C.B.Anfinzen: Ann.Rev.Biochem. 40,259(1971)
29. H.Fritz, E.Wunderer, B.Dittmann: Z.Physiol.Chem. 353,893
(1972)
30. P.Cuatrecasas, M.Wilchek, C.B.Anfinzen: Proc.Nat.Acad.Sci.
USA 61,636(1968)
31. H.Tschesche: Angew.Chem. 86,21(1974)
32. M.Sprinzi, K.H.Scheit, H.Sternbach, F.v.der Haar,
F.Cramer: Biochem.Biophys.Res.Comm. 51,881(1973)
33. K.Brocklehurst, J.Carlsson, M.P.J.Kierstan, E.M.Crook:
Biochem.J. 133,573(1973)
34. J.Carlsson, A.Svensson: FEBS Lett. 42,183(1974)
35. K.Randerath: Dünnschicht-Chromatographie, Verlag Chemie,
Weinheim 1975
36. D.J.Shaw: Electrophoresis, Academic Press, London 1969
37. H.Bender, J.Lehmann, K.Wallenfels: Biochim.Biophys.Acta
36,309(1959)
38. Farbenfabriken Bayer AG: Brit.Pat. 820 526; CA 53,9584
(1959)
39. H.O.Bouveng, H.Kiessling, B.Lindberg, J.McKay: Acta chem.
scand. 16,615(1962)

40. H.O.Bouveng, H.Kiessling, B.Lindberg, J.McKay: Acta chem. scand. 17,797(1963)
41. H.O.Bouveng, H.Kiessling, B.Lindberg, J.McKay: Acta chem. scand. 17,1351(1963)
42. K.Wallenfels, H.Bender, G.Keilich, G.Bechtler: Angew.Chem. 73,245(1961)
43. K.Wallenfels, G.Bechtler, R.Kuhn, H.Tritschmann: Angew.Chem. 75,1014(1963)
44. K.Wallenfels, G.Keilich, G.Bechtler, G.Freudenberger: Biochem.Z. 341,433(1965)
45. K.Freudenberger, E.Schaaf, G.Dumpert, T.Ploetz: Naturwissensch. 27,850(1939)
46. W.Banks, C.T.Greenwood: Stärke 19,197(1967)
47. Y.Tsojisaka, J.Fukumoto, T.Yamamoto: Nature 181,770(1958)
48. H.Bender, K.Wallenfels: Biochem.Z. 334,79(1961)
49. S.Yuen: Pullulan and its new applications, Hayashibara Biochem.Lab.Inc.,Okayama 1974; Process Biochemistry Nov.1974 p.7
50. G.Keilich, H.Bittiger: Biopolymers 11,1997(1972)
51. G.Keilich, K.Tihlarik, E.Husemann: Makromol.Chem. 120,87 (1968)
52. L.Könczöl: Diplomarbeit, Universität Freiburg 1975
53. G.Bechtler: Diplomarbeit, Universität Freiburg 1960; Dissertation, Universität Freiburg 1962
54. G.Keilich, P.Sahinen, E.Husemann: Makromol.Chem. 141,117 (1971)
55. B.Söderqvist, G.Falke: BRD Offenlegungsschrift 1,443 396 (1968)

56. P.Flodin: BRD Offenlegungsschrift 1 443 359 (1968)
57. P.Flodin, J.Porath: BRD Pat. 1 292 883 (1969)
58. A.Grabert, H.Seide: DDR Pat. 55 649 (1967); CA 68,4195u (1967)
59. S.Moore, D.H.Spackman, W.H.Stein: Anal.Chem. 30,1185(1958)
60. F.Turba: Adv.in Enzymology 22,417(1960)
61. O.Smithies: Biochem.J. 61,629(1955)
62. O.Smithies: Arch.Biochem.Biophys.Suppl. 1,125(1962)
63. M.P.Tombs: Anal.Biochem. 13,121(1965)
64. P.H.Hermans: Gels in Colloid Science (Kruyt ed.) 2,483 Amsterdam 1949
65. T.C.Laurent, J.Killander: J.Chromatog. 14,317(1964)
66. P.Andrews: Biochem.J. 91,222(1964)
67. J.R.Whitaker: Anal.Chem. 35,1950(1963)
68. H.Determann, W.Michel: J.Chromatog. 25,303(1966)
69. P.G.Squire: Arch.Biochem.Biophys. 107,471(1964)
70. G.K.Ackers: Biochemistry 3,723(1964)
71. T.Wieland, P.Duesberg, H.Determann: Biochem.Z. 337,303(1963)
72. K.Granath, P.Flodin: Makromol.Chem. 48,160(1961)
73. J.Porath: Pure Appl.Chem. 6,233(1963)
74. P.Flodin, D.W.Kupke: Biochem.Biophys.Acta 21,368(1956)
75. R.J.Wieme: Agar Gel Electrophoresis, Elsevier, Amsterdam 1965
76. M.O.Weaver, R.R.Montgomery, L.D.Miller, V.E.Sohns, G.F.Fanta, W.M.Doane: Stärke 29,413(1977)
77. M.O.Weaver, E.B.Bagley, G.F.Fanta, W.M.Doane: USA Pat. 3 935 099 (1976)

78. H.Fischer, P.G.Munder, E.Vaubel: Tätigkeitsbericht der
Schutzkommission beim Bundesminister des Inneren für das
Jahr 1977, S.407
79. W.A.Reeves, J.D.Guthrie: USA Pat. 2 824 779; CA 52,
8579e(1958)
80. R.J.Hartmann, E.J.Fujiwara: BRD Auslegeschrift 1 301 893
(1961); CA 72,P56 919k(1969)
81. L.M.Soffer, E.Carpenter: Text.Res.J. 24,847(1954)
82. W.Copper, R.K.Smith: Makromol.Chem. 40,148(1960)
83. C.B.Laurell, J.Pierce, U.Persson, E.Thulin: Eur.J.Biochem.
57,107(1975)
84. R.Axén, H.Drevin, J.Carlsson: Acta chem.Scand. B 29,471(1975)
85. C.B.Laurell, E.Thulin, R.P.Bywater: Anal.Biochem. 81,336
(1977)
86. E.B.Tilden, C.S.Hudson: J.Bacteriol. 43,527(1942)
87. D.French, M.L.Levine, E.Norberg, P.Nordin, J.H.Pazur,
G.M.Wild: J.Am.Chem.Soc. 76,2387(1954)
88. S.Schwimmer, J.A.Garibaldi: Cereal Chem. 29,108(1952)
89. S.Schwimmer: Arch.Biochem.Biophys. 43,108(1953)
90. S.Kobayashi, K.Kainuma, S.Suzuki: Carbohyd.Res. 61,229(1978)
91. H.Bender: Arch.Microbiol. 111,271(1977)
92. F.Schardinger: Z.Untersuch.Nahr.u.Genussm. 6,865(1903)
93. F.Schardinger: Wien.klin.Wochenschr. 17,207(1904)
94. D.French: Advan.Carbohyd.Chem. 12,189(1957)
95. H.Schlenk, D.M.Sand: J.Am.Chem.Soc. 83,2312(1961)
96. K.Freudenberg, H.Boppel, M.Meyer-Delius: Naturwissensch.
26,123(1938)

97. K.Freudenberg, F.Cramer: Z.Naturforsch. 36,464(1948)
98. D.French, R.E.Rundle: J.Am.Chem.Soc. 64,1651(1942)
99. D.French, D.W.Knapp, J.H.Pazur: J.Am.Chem.Soc. 72,5150
(1950)
100. M.L.Bender, M.Komiyama: Cyclodextrin Chemistry, Springer
Verl.,Berlin, Heidelberg, New York 1978
101. W.Saenger, M.Noltemeyer, P.C.Monor, B.Hingerty, B.Klar:
Bioorg.Chem. 5,187(1976)
102. D.A.Rees: J.Chem.Soc. B,877(1970)
103. P.C.Monor, W.Saenger: Nature 237,392(1972)
104. P.C.Monor, W.Saenger: J.Am.Chem.Soc. 96,3630(1974)
105. M.L.Bender: Mechanisms of Homogenous Catalysis from
Protons to Proteins, S.373-382, Wiley-Interscience,
New York, London, Sidney, Toronto 1971
106. M.L.Bender, R.L.v.Etten, G.A.Clowes, J.F.Sebastian:
J.Am.Chem.Soc. 88,2318(1966)
107. M.L.Bender, R.L.v.Etten, G.A.Clowes: J.Am.Chem.Soc.
88,2319(1966)
108. J.Tabushi, K.Fujita, H.Kawakubo: J.Am.Chem.Soc. 99,6456
(1977)
109. R.Breslow, P.Campbell: J.Am.Chem.Soc. 91,3085(1969)
110. R.Breslow, P.Campbell: Bioorganic Chem. 1,140(1971)
111. J.F.Kennedy: Advan.Carbohyd.Chem. 29,402(1974)
112. N.Wiedenhof, J.N.J.J.Lammers: Carbohyd.Res. 4,318(1967)
113. K.Wallenfels, P.Földi, H.Niermann, H.Bender, D.Linder:
Carbohyd.Res. 61,359(1978)
114. F.Cramer: Einschlußverbindungen, S.49-55, Springer-Verl.,
Berlin, Heidelberg 1954

115. F.Cramer, F.M.Henglein: Chem.Ber. 90,2561(1957)
116. N.Wiedenhof, J.N.J.J.Lammers, C.L.v.Panthaleon v.Eck:
Stärke 21,119(1969)
117. J.N.J.J.Lammers, J.L.Koole, J.Hurkmans: Stärke 23,167
(1971)
118. J.N.J.J.Lammers, J.L.Koole, A.J.G.v.Diemen: Rec.Trav.
Chim. 91,483(1972)
119. J.N.J.J.Lammers, A.J.G.v.Diemen: Rec.Trav.Chim. 91,733
(1972)
120. J.N.J.J.Lammers: Rec.Trav.Chim. 91,1163(1972)
121. S.Hakomori: J.Biochem.(Tokio) 55,205(1964)
122. W.Banks, C.T.Greenwood, D.D.Muir: Stärke 24,181(1972)
123. J.Satoda: BRD Offenlegungsschrift 2 260 785 (1972)
124. H.Hershenson, J.M.Brake, M.Roberts: BRD Offenlegungs-
schrift 1 813 571 (1968)
125. H.G.Merkus, J.W.Mourits, L.de Galan, W.A.de Jong:
Stärke 29,406(1977)
126. F.Cramer, U.Bergmann, P.C.Monor, M.Noltemeyer, W.Saenger:
Liebigs Ann.Chem. 1976,1169(1976)
127. F.Cramer, H.Hettler: Naturwissensch. 54,625(1967)
128. F.R.Senti, S.R.Erlander: Non Stoichiometric Compounds
(L.Mandelcorn ed.), S.568-605, Academic Press, New York
1964
129. R.K.McMullen, W.Saenger, J.Fayos, D.Mootz: Carbohyd.Res.
31,37(1973)
130. J.Lehmann: Chemie der Kohlenhydrate, S.142ff. Thieme-
Verl., Stuttgart 1976

131. B.Casu, M.Reggiani, G.G.Gallo, A.Vigevani: Tetrahedron 24,803(1968)
132. R.Kuhn, H.Trischmann: Chem.Ber. 96,284(1963)
133. R.Breslow, H.Kohn, B.Siegel: Tetrahedron Lett. 20,1645 (1976)
134. J.Szejtli, E.Fenyvesi, B.Zsádon: Stärke 30,127(1978)
135. B.S.Enevoldsen, L.Reimann, N.L.Hansen: FEBS-Lett. 79, 121(1977)
136. P.Vretblad: FEBS-Lett. 47,86(1974)
137. A.Hoschke, E.László, J.Holló: Stärke 28,426(1976)
138. A.Harada, M.Furue, S.Nozakura: Macromolecules 2,701(1976)
139. J.Solms, R.H.Egli: Helv.Chim.Acta 48,1225(1965)
140. Societè des Produits Nestlè SA: Niederl.Pat. 6 505 361 (1965)
141. N.Wiedenhof: Stärke 21,163(1969)
142. N.Wiedenhof, R.G.Trieling: Stärke 23,129(1971)
143. A.Harada, M.Furue, S.Nozakura: J.Polym.Sci., Polym.Chem. Ed. 16,189(1978)
144. D.W.Griffith, M.L.Bender: Advan.Catal. 23,209(1973)
145. T.Osa, T.Matsue, M.Fujihira: Heterocycles 6,1833(1977)
146. J.Szejtli, Z.Budai, M.Kajtar: Magy.Chem.Foly. 84,68(1978)
147. P.Földi: Dissertation Universität Freiburg 1977
148. S.Matsubara: Bull.Chem.Soc.Jpn. 34,718(1961)
149. K.Wallenfels, G.Laule: unveröffentlicht
150. R.W.Eyler, E.D.Klug, F.Diephuis: Anal.Chem. 19,24(1947)
151. K.W.Pepper, D.Reichenberg, D.K.Hale: J.Am.Chem.Soc. 74, 3129(1952)

152. K.Fischer: Angew.Chem. 48,394(1935)
153. E.Eberius: Wasserbestimmungen mit Karl-Fischer-Lösungen,
Verl.Chemie, Weinheim 1958
154. N.V.Carroll, R.W.Longley, R.H.Roe: J.Biol.Chem. 220,583
(1956)
155. S.Zeisel: Monatsh.Chem. 7,406(1886)

8. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

BC	Benzylchlorid
CD	Cyclodextrin
CGT	Cyclodextrin-glucanotransferase
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DS	Substitutionsgrad
ECH	Epichlorhydrin
HÄ-	Hydroxyäthyl-
M	Molekulargewicht
NP-	Nitrophenyl
NPG	Nitrophenylglucosid
WRV	Wasserrückhaltevermögen

Symbole für die Gelchromatographie:

K_d	Verteilungskoeffizient
K_{av}	verfügbare Verteilungskoeffizient
V_t	Gesamtvolumen der Gelpackung
V_e	Elutionsvolumen
V_o	äußeres Volumen (Ausschlußvolumen)
V_i	inneres Volumen
V_m	Volumen der Gelmatrix

Lebenslauf:

Angaben zur Person:

Name: . Laszlo Franz Ernst Könczöl
Geburtstag: 16.März 1947
Geburtsort: Dingolfing (Bayern)
Eltern: Dr.Ladislaus Könczöl und seine Ehefrau
Margit geb. Bangha
Heirat: 3.Juli 1975, ein Kind

Schulischer und beruflicher Werdegang:

1953-1957 Volksschule in St.Blasien und Freiburg i.Br.
1957-1966 Humanistisches Gymnasium Kolleg St.Blasien
4.März 1966 Reifeprüfung
1966-1968 Grundwehrdienst bei der Bundeswehr
SS 1968- Studium des Faches Chemie an der
WS 1974/75 Universität Freiburg i.Br.
Juli 1974- Diplomarbeit am Lehrstuhl Biochemie des
Februar 1975 Chemischen Laboratoriums der Universität
Freiburg
Titel: Darstellung und Eigenschaften von
funktionellen Derivaten des Pullulan
25.Februar 1975 Diplomhauptexamen
April 1975- Doktorarbeit am Lehrstuhl Biochemie des
Oktober 1978 Chemischen Laboratoriums der Universität
Freiburg unter der Leitung von
Prof.Dr.K.Wallenfels
Juni 1974- Wissenschaftliche Hilfskraft bzw. wiss.
Dezember 1977 Mitarbeiter am Lehrstuhl Biochemie

